

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**PACIENTŲ, KURIEMS ĮTARIAMA ŪMINĖ PROMIELOCITINĖ
LEUKEMIJA, BLASTŲ BIOŽYMENŲ RAIŠKOS YPATUMAI**

Magistrantė AISTĖ POŠKUTĖ _____

(parašas)

Darbo vadovas
dr., doc. R. Matuzevičienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2016 m., Vilnius

TURINYS

TURINYS.....	1
ĮVADAS	1
1. LITERATŪRINĖ ANALIZĖ.....	2
1.1. Promielocitinės leukemijos tyrimų raida ir ištyrimas	2
1.2. Kraujodaros procesas	3
1.3. Leukemija. Jos rūšys.	5
1.3.1. Promielocitinės leukemijos etiologija ir patogenezė.....	9
1.3.2. Ūminės promielocitinės leukemijos morfologija	12
1.3.3. Ūminės promielocitinės leukemijos dignostikos metodai.....	14
1.4. Hemopoezinių ląstelių žymenys	15
1.5. Ūminės promielocitinės leukemijos gydymas	17
2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI.....	19
2.1. Tyrimų metodai.....	19
2.1.1. Tėkmės citometrijos tyrimo principai	19
2.1.2. Tyrimas automatizuotu hematologiniu analizatoriumi	23
2.1.3. Mėginių ruošimo tyrimams metodika	24
2.2. Tyrimų medžiaga	31
3. TYRIMŲ REZULTATAI.....	32
4. TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS.....	47
IŠVADOS	52
SANTRAUKA.....	53
SUMMARY.....	54
LITERATŪRA	55
PRIEDAI.....	63

ĮVADAS

Ūminė promielocitinė leukemija – viena iš kraujo vėžio formų, kurios mirtingumas siekia 30 %. Ši vėžio forma sudaro nuo 10 iki 15 proc. visų ūminių leukemijų. Jungtinėse Amerikos Valstijose kasmet užregistruojama nuo 500 iki 600 naujų šios ligos atvejų. Europoje šios leukemijos dažnis yra 0,145 atvejų 100 000 gyventojų per metus. Tai dažniausiai vyresnio amžiaus žmonių liga. Amžiaus vidurkis sergančiųjų šia liga 54 metai, 62 proc. sergančiųjų yra moterys, 38 proc. vyrai [57;67;42]. Ūminė promielocitinė leukemija yra nulemta dviejų genų mutacijos, kuri atsiranda dėl įvykusios translokacijos tarp 15 ir 17 chromosomų porų. Negydant šios ligos išėjimas – letali, galinti pasireikšti per kelias savaites ar mėnesius. Dažna mirties priežastis – DIC sindromas, įvairūs nukraujavimai. Tačiau tinkamai ir laiku diagnozavus šią ligą galima pradėti efektyvų gydymą trans-retinoine rūgštimi, kurio efektyvumas siekia 90 proc.[59;1;18].

Taigi ūminę promielocitinę leukemiją būtina nustatyti kuo anksčiau, tiksliau ir greičiau. Vienas iš šios leukemijos nustatymo metodų remiasi blastų biožymenų raiškos ypatumais. Ūminei promielocitinei leukemijai yra būdingas tam tikras blastų biožymenų raiškos derinys, kurį nustatčius tėkmės citometru galima įtarti, o gretimai atlikus citomorfologinį ir genetinius tyrimus ir patvirtinti ūminės promielocitinės leukemijos diagnozę. Galutinė diagnozė tvirtinama gavus genetinio tyrimo rezultatus.

Šiuo darbu siekiama išsiaiškinti ūminei promielocitinei leukemijai būdingiausias blastų biožymenų raiškos kombinacijas.

Darbo tikslas – ištirti ūminei promielocitinei leukemijai būdingiausias blastų imunofenotipus tėkmės citometrijos metodu.

Darbo uždaviniai:

1. Rasti blastų biožymenų raiškos dėsningumus pacientams, kuriems įtariama ūminė promielocitinė leukemija.
2. Nustatyti blastų imunofenotipų spektrą esant ūminei promielocitinei leukemijai.
3. Identifikuoti ūminei promielocitinei leukemijai jautriausius ir specifiskiausius laboratorinių tyrimų parametrus.

1. LITERATŪRINĖ ANALIZĖ

1.1. Promielocitinės leukemijos tyrimų raida ir ištyrimas

Pirmą kartą kaip atskira ūminės leukemijos forma ūminė promielocitinė leukemija buvo aprašyta 1957 metais norvegų hematologo L. K. Hillestado. Hillestadas šią ūminės leukemijos formą apibūdino kaip trumpos eigos ligą, sukeliančią staigią mirtį. Buvo pastebėta, kad šiai leukemijos formai būdingi ypač gausūs kraujavimai, maža fibrinogeno koncentracija kraujyje, sumažėjęs trombocitų kiekis [20]. Vėliau, 1959 metais, prancūzų medikas J. Bernard smulkiau apibūdino ūminės promielocitinės leukemijos požymius, remdamasis citologija. Šių tyrėjų įžvalgos stipriai prisidėjo prie vėliau atsiradusių šios leukemijos gydymo metodų [44]. 1976 metais pastebėta, kad ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėms gali būti būdingos ir Auerio lazdelės, gausiai sutinkamos promielocito citoplazmoje. Taip pat buvo išskirtas ir hipogrūdėtas ūminės promielocitinės leukemijos variantas (M3v), atsižvelgiant į citoplazmos grūdėtumą. Išsamiau tiriant šią leukemijos formą, netrukus Čikagoje, vadovaujant J. Rowley, buvo identifikuota, kad ūminė promielocitinė leukemija yra daugeliu atvejų yra nulemta genetinės 15 ir 17 chromosomų porų mutacijos (translokacijos). 1988 metais Šanchajaus Rui-Jin ligoninėje promielocitinei leukemijai gydyti pradėtas naudoti ATRA metodas (Lo-Cocco, Cicconi, 2011) [44]. Devintojo dešimtmečio pradžioje buvo pradėta analizuoti molekulinį ūminės promielocitinės leukemijos susidarymo mechanizmą bei nustatyta, kad promielocitų formavimąsi nulemia mutavę PML ir RAR α genai [65]. Po įvairiausių tyrimų, vykdytų visą dešimtmetį, kinų mokslininkai, remdamiesi gerais eksperimentinio gydymo rezultatais, pasiūlė ūminę promielocitinę leukemiją gydyti arseno trioksidu [5].

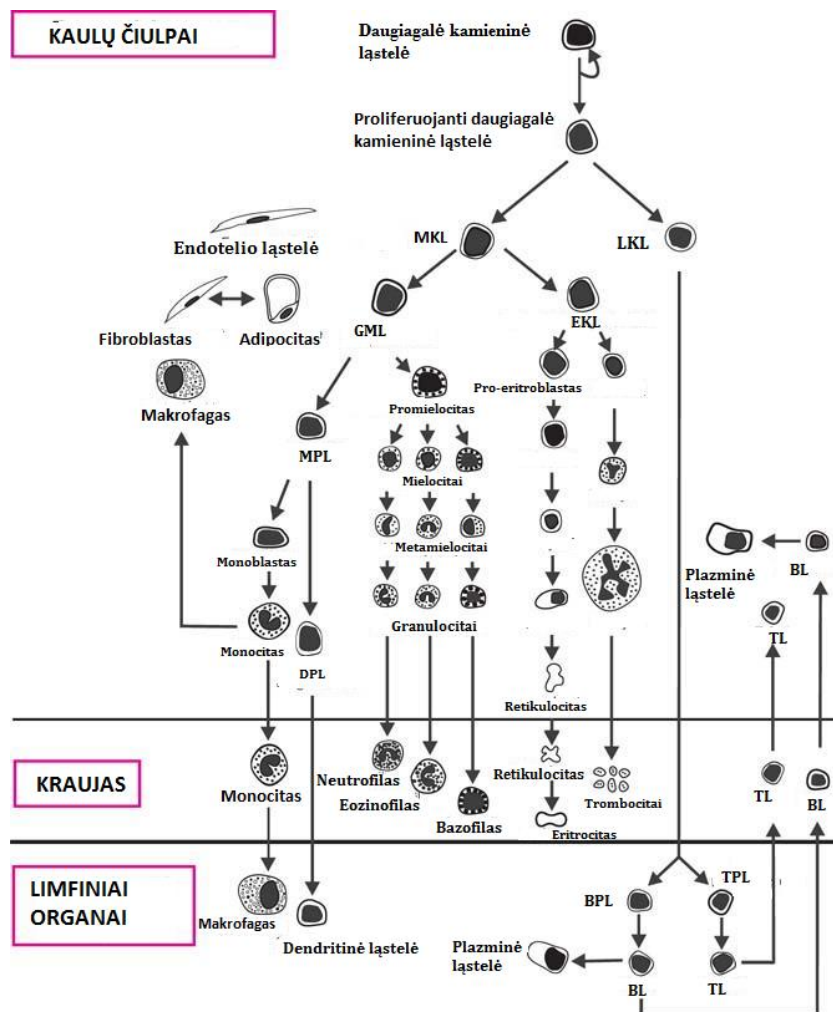
Devinto dešimtmečio antroje pusėje, atsiradus tėkmės citometrijos įrangai, ūminė promielocitinė leukemija pradėta nustatinėti ir pagal hemopoezinių ląstelių žymenis. Atlikus mielogramą yra vertinamas promielocitų kiekis periferiniame kraujyje ar kaulų čiulpuose, įvertinami mieloperoksidazės reakcijos rezultatai. Tai padeda lengviau identifikuoti ūminę promielocitinę leukemiją [44]. Šiuo metu ūminė proielocitinė leukemija yra diagnozuojama remiantis ląstelių citologija, tėkmės citometrijos analize bei molekulinės genetikos rezultatais. Daugiausiai dėmesio yra skiriama ūminės promielocitinės leukemijos gydymui, vaistų dozėms ir gydymo trukmei [29].

1.2. Kraujodaros procesas

Kraujodara arba hemopoezė – griežtai reguliuojamas kraujo ląstelių gamybos procesas. Kraujodaros procesas suaugusiems normaliai vyksta kaulų čiulpuose, tačiau patologijos atveju kraujodaros procesas gali vykti ir blužnyje ar kepenyse. Sveiko suaugusio žmogaus organizme per dieną susiformuoja 10^{11} – 10^{12} kraujo ląstelių. Visos kraujo ląstelės hemopoezės metu vystosi iš hemopoezės kamieninių ląstelių (HKL) [22]. Hemopoezės kamieninės ląstelės geba neribotai dalintis, atsinaujinti bei diferencijuotis į specializuotas kraujo ląsteles. Kraujodaros procesas prasideda dar ankstyvojoje embriogenezėje. Kraujo ląstelės pradeda gamintis trynio maišo mezenchimoje, kol dar nėra susiformavę kaulų čiulpai, kurie dominuoti pradeda tik prieš vaisiaus gimimą [52]. Vėliau kraujo gamyba vyksta nugarinėje aortos dalyje, AGM regione (aortos-gonadinės-mezonefros regionas). Prasidėjus 6-tai–7-tai vaisiaus vystymosi savaitėms kraujo gamyba iš nugarinės aortos dalies persikelia į blužnį ir kepenis. Blužnyje ir kepenyse kraujo ląstelės yra gaminamos pirmuosius kūdikio gyvenimo mėnesius ir maždaug po pusmečio (6-tame–7-tame gyvenimo mėnesyje) pagrindine kraujo ląstelių gamybos vieta virsta kaulų čiulpai [37]. Kraujo ląstelės kūdikio organizme gaminamos visuose kaulų čiulpuose. Individui bręstant, raudonuosius kaulų čiulpus keičia geltonieji kaulų čiulpai ir suaugusio žmogaus organizme kraujo ląstelių gamyba vyksta nebe visuose, o tik tam tikruose kaulų čiulpuose: centriniame skelete – kaukolėje, klubakaukyje, krūtinkaukyje, slanksteliuose, žastikaulio bei šlaunikaulio proksimaliniuose galuose. Normaliomis sąlygomis kraujo ląstelių gamybos vieta nekinta, iš kaulų čiulpų kraujo ląstelės patenka į bendrąją kraujotaką [45].

Visa kraujo ląstelių gamyba kaulų čiulpuose prasideda nuo daugiagalės kamieninės ląstelės (DKL) (1 pav). Daugiagalė kamieninė ląstelė vėliau šakojasi į dviejų tipų ląstelių kamienus: mieloidines kamienines ląsteles (MKL) bei limfoidines kamienines ląsteles (LKL). Iš šių dviejų kamienų susiformuoja visos kraujo ląstelės. Limfoidinių kamieninių ląstelių kamienas limfiniuose organuose skyla į dvi šakas: B ląstelių pirmtakus (BL) ir T ląstelių pirmtakus (TL). B ląstelių pirmtakai virsta B limfoblastais, kurie vėliau diferencijuojasi į B limfocitus ir plazmines ląsteles. T ląstelių pirmtakas formuoja T limfoblastus, kurie periferiniame kraujyje virsta T limfocitais [29;33]. Iš mieloidinio kamieno daugiagalės ląstelės gaminasi daug įvairių funkciškai ir morfologiškai skirtingų kraujo ląstelių. Mieloidinė kamieninė ląstelė kaulų čiulpuose diferencijuojasi į dvi šakas: granulocitų-monocitų kamieninę ląstelę (GML) bei eritroidinių kamieninių ląstelių šaką (EKL). Iš granulocitų-monocitų kamieninės ląstelės formuojasi dar dvi atšakos: monodendritinė kamieninė ląstelė (MPL) ir promielocitinė ląstelė. Proliferuojant ir diferencijuojant monodendritinei ląstelei gaminami monoblastai, kaulų

čiulpuose vėliau tampantys monocitais, kurie limfiniuose organuose geba virsti makrofagais. Iš promielocitų formuojasi 3 tipų mielocitai, vėliau virstantys 3 tipų metamielocitais, kurie diferencijuojasi į neutrofilus, eozinofilus ir bazofilus [29]. Iš eritroidinių kamieninių ląstelių atšakos per daugybę stadijų kaulų čiulpuose (kolonijas stimuliuojančios eritroidinės ląstelės, kolonijas formuojančios eritroidinės ląstelės – normoblastas) pagaminami retikulocitai, kurie, veikiant eritropoetinui, kraujyje virsta subrendusiais eritrocitais [73]. Trombocitai taip pat gaminami iš eritroidinės kamieninės ląstelės, megakarioblastui virstant megakariocitu, vėliau trombocitu [29].



1 pav. Hemopoezės schema [29].

1.3. Leukemija. Jos rūšys.

Leukemija (kraujo vėžys) – viena iš vėžio formų, kuria sergant sutrinka normalių kraujo ląstelių gamyba. Sergant leukemija dėl sutrikusios kraujo gamybos kaulų čiulpuose periferiniame kraujyje ir pačiuose kaulų čiulpuose padaugėja nebrandžių, funkciškai nepilnaverčių kraujo ląstelių – blastų. Kraujo vėžio atveju ląstelių hiperplazija (per daug intensyvi ląstelių gamyba) yra negrįžtama, pirminės kraujo ląstelės gausiai proliferuoja, tačiau jų diferenciacija yra lėta arba jos beveik nėra [31]. Sergant leukemija taip pat susiformuoja kraujo gamybos židiniai tuose organuose, kurie natūraliai nedalyvauja hemopoezėje (gimdoje, inkstuose, kasoje, kepenyse) dėl organų retikulinės stromos metaplazijos (vieno audinio pakeitimas kitu) į kraujo elementus. Leukemijos atsiradimą lemti gali daugelis veiksnių, tokių kaip chemikalų poveikis, chemoterapija bei spindulinis gydymas sergant kitomis vėžio formomis, genetiniai sutrikimai, kitos hematologinės ligos, radiacija, rūkymas ir kita [31].

Kliniškai skiriamos dvi leukemijos formos: ūminė ir lėtinė. Šios formos išskiriamos, atsižvelgiant į ligos eigą ir ląstelių brandumo laipsnį. Lėtinės leukemijos dažniausiai tęsiasi ne vienerius metus, o kraujyje ir kaulų čiulpuose randama daugiau brandžių ląstelių, nei ūminių leukemijų atvejais. Lėtinės leukemijos dažniausiai yra būdingos suaugusiems žmonėms, vaikai jomis serga retai [13]. Daugelis lėtinių leukemijų būna besimptomės, taip pat ligoniams gali pasireikšti citopenija ar leukocitozė. Yra išskiriamos dvi lėtinės leukemijos formos: lėtinė mieloleukemija ir lėtinė limfocitų leukemija, kurios savo ruožtu skirstomos į dar smulkesnes leukemijų grupes [53].

Ūminės leukemijos taip pat yra skirstomos į keletą atskirų grupių, atsižvelgiant į jų morfologiją, kilmę, genetines priežastis ir kita (1, 2 lentelės). Ūminei leukemijai būdinga tai, kad ši leukemijos forma pasireiškia greitai ir agresyvia eiga [53]. Piktybinės, negebančios diferencijuotis ir nesubrendusios ląstelės kaupiasi kaulų čiulpuose. Dėl spartaus vėžinių kraujo ląstelių dauginimosi pradedama slopinti kaulų čiulpų veikla: kraujyje mažėja leukocitų, eritrocitų bei trombocitų. Dėl piktybinių ląstelių infiltracijos kaulų čiulpuose ir vidaus organuose vystosi kaulų čiulpų ir infiltruotų piktybinėmis ląstelėmis organų nepakankamumas [37]. Dėl leukocitų, eritrocitų ir trombocitų sumažėjimo kraujyje mažėja organizmo atsparumas infekcinėms ligoms, vystosi anemija, taip pat didėja įvairių kraujavimų rizika [53].

Ūminės leukemijas sukelia mutacijos hemopoezinėje ląstelėje ar hemopoezinės ląstelės pirmtake. Dėl somatinės mutacijos hemopoezinėje ląstelėje sutrinka ląstelių apoptozės, dalijimosi ir diferenciacijos procesai. Įvairios ūminės leukemijos formos stipriai skiriasi viena nuo kitos, nuo ūminės leukemijos tipo priklauso paciento ligos prognozė, gydymas [39]. Taigi

svarbu turėti bendrą ūminių leukemijų klasifikaciją. Šiuo metu pasaulyje yra naudojamos dvi ūminių leukemijų klasifikacijos: FAB ir PSO. Leukemijos šiose klasifikacijose yra skirstomos į grupes, atsižvelgiant į morfologinius, imunofenotipinius, genetinius pakitimus [4].

FAB klasifikacija. 1976 metais paskelbta French-American-British (FAB) klasifikacija. Ši klasifikacija suskirsto visas ūmines leukemijas į tris stambias grupes, iš kurių yra išskiriami smulkesni leukemijų tipai (1 lentelė). Šioje klasifikacijoje leukemijų tipai išskiriami atsižvelgiant į vėžinių ląstelių kilmę ir blastų morfologinius požymius [79].

1 lentelė. Ūminės leukemijos FAB klasifikacija [79].

FAB klasifikacija	Leukemijos tipas	
Ūminė mielogeninė leukemija	M0	Ūminė mielogeninė leukemija su minimalia diferenciacija
	M1	Ūminė nebrandi mielogeninė leukemija
	M2	Ūminė brandi mielogeninė leukemija
	M3	Ūminė promielocitinė leukemija
	M3v	Hipogrūdėtas ūminės promielocitinės leukemijos variantas
	M4	Ūminė mielomonocitinė leukemija
	M4eos	Ūminė mielomonocitinė leukemija su eozinofilija
	M5a	Ūminė monoblastinė leukemija
	M5b	Ūminė monocitinė leukemija
	M6	Ūminė eritroidinė leukemija
	M7	Ūminė megakarioblastinė leukemija
Ūminė limfoblastinė leukemija	L1	Limfocitų pirmtakų neoplazmos
	L2	
	L3	Brandžių B ląstelių neoplazmos

PSO klasifikacija. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) klasifikacija gana nauja. Paskelbta 2001 metais, atnaujinta 2008. Klasifikacija paremta citogenetiniais ir molekuliniais leukemijų žymenimis. Šioje klasifikacijoje leukemijos suskirstytos į 11 stambių grupių, kurios, kaip ir FAB klasifikacijoje, yra skirstomos į smulkesnes skiltis [80].

2 lentelė. PSO klasifikacija [74].

Tipas	Aprašymas
<p>Ūminė mieloidinė leukemija su besikartojančiais genetiniais sutrikimais</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ŪML su translokacijomis tarp 8 ir 21 chromosomų [t(8;21)(q22;q22);] • ŪML su 16 chromosomos inversija [inv(16)(p13.1q22)] • ŪPL su 15 ir 17 chromosomų mutacijom [t(15;17)(q22;q12);] • ŪML su 9 ir 11 chromosomų mutacijom [t(9;11)(p22;q23);] • ŪML su 6 ir 9 chromosomų mutacijom [t(6;9)(p23;q34);] • ŪML su 3-čia invertuota chromosoma [inv(3)(q21q26.2)] • Megakarioblastinė ŪML su translokacija tarp 1 ir 22 chromosomų [t(1;22)(p13;q13);] • ŪML su mutavusiu NPM1 genu • ŪML su mutavusiu CEBPA genu
<p>Ūminė mieloidinė leukemija su mielodisplaziniais pakitimais</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sudėtingo kariotipo ŪML • Nesubalansuotos mutacijos: <ol style="list-style-type: none"> a) 7-tos chromosomos delecija [del(7q);] b) 5-tos chromosomos delecija [del(5q);] c) nesubalansuoti pokyčiai 17 chromosomoje [i(17q)/t(17p);] d) 13-tos chromosomos delecija [del(13q);] e) 11-tos chromosomos delecija [del(11q);] f) 12-tos chromosomų poros delecija

	<p>g) 9-tos chromosomų poros delecijos [del(9q);]</p> <p>h) aberantiniai pokyčiai X chromosomoje [idic(X)(q13);]</p> <ul style="list-style-type: none"> • Subbalancuotos mutacijos: <ul style="list-style-type: none"> a) translokacijos tarp 11 ir 16 chromosomų porų [t(11;16)(q23;q13.3);] b) translokacija tarp 3 ir 21 chromosomų poros [t(3;21)(q26.2;q22.1);] c) translokacija tarp 1 ir 3 chromosomų porų [t(1;3)(p36.3;q21.1);] d) Translokacija tarp 2 ir 11 chromosomų porų [t(2;11)(p21;q23);] e) translokacija tarp 5 ir 12 chromosomų poros [t(5;12)(q33;p12);] f) translokacija tarp 5 ir 7 chromosomų poros [t(5;7)(q33;q11.2);] g) translokacija tarp 5 ir 17 chromosomų porų [t(5;17)(q33;p13);] h) translokacija tarp 5 ir 10 chromosomų poros [t(5;10)(q33;q21);] i) translokacija tarp 3 ir 5 chromosomų poros [t(3;5)(q25;q34);]
Su terapija susijusios mieloidinės	Chemoterapijos ar radioterapijos sukeltos

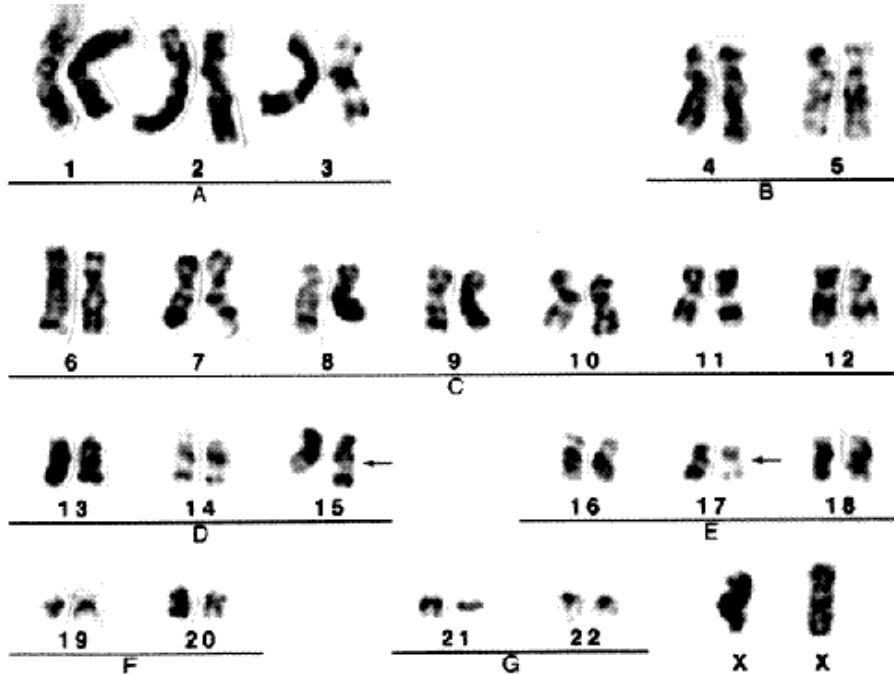
neoplazmos	neoplazmos
Mieloidinė sarkoma	
Mieloidinės proliferacijos susijusios su Dauno sindromu	
Blastinės dendritinių ląstelių neoplazmos	
ŪML neklasifikuojama kitaip	<ul style="list-style-type: none"> • ŪML su minimaliomis diferenciacijomis • Nebrandi ŪML • Brandi ŪML • Ūminė mielomonocitinė leukemija • Ūminė monocitinė ir monoblastinė leukemija • Ūminė eritroidinė leukemija • Ūminė megakarioblastinė leukemija • Ūminė bazofilinė leukemija • Ūminė panmielozė su mielofibroze

1.3.1. Promielocitinės leukemijos etiologija ir patogenezė

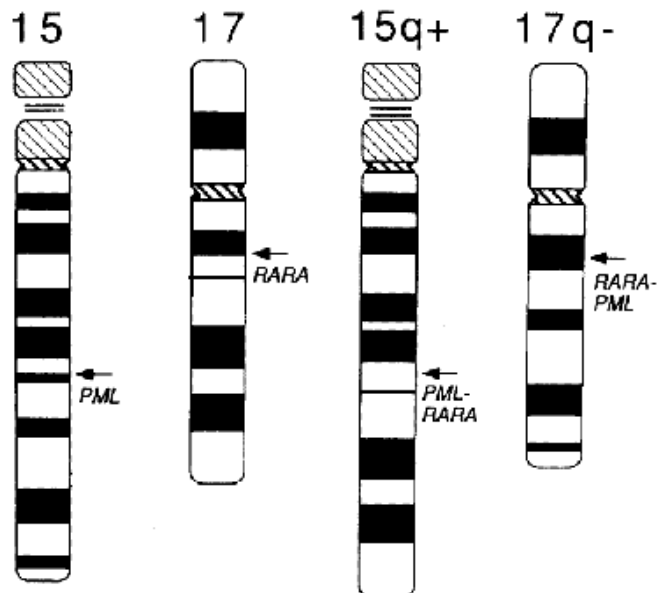
Promielocitinė leukemija – viena iš ūminių mieloidinės leukemijos vėžio formų. Ūminės mieloidinės leukemijos yra suaugusiųjų kraujo liga. Šia liga serga maždaug 3 iš 100000 gyventojų. Nepaisant to, kad mieloidinės leukemijos dažniausiai yra suaugusiųjų ligos, jomis gali sirgti ir vaikai (10–15 proc. visų leukemijų) [37].

Remiantis literatūros duomenimis, 95 % ūminės promielocitinės leukemijos atvejų yra nulemti genetiškai. Šios kraujo vėžio formos vystymąsi lemia subalansuota reciprokinė translokacija tarp 15 ir 17 chromosomų ilgujų pečių ($t(15;17)(22;q11.2-12)$) (2, 3 pav.) [34]. Įvykus translokacijai tarp 15 ir 17 chromosomų porų susiformuoja PML-RAR α (4 pav.) genas-mutantas, veikiantis transkripcijos faktorių, kuris sutrikdo promielocitų virtimą brandesnėmis ląstelėmis. Normaliomis sąlygomis RAR α yra labai svarbus kamieninių mielodinių ląstelių diferencijai į brandžias mieloidinės linijos ląsteles. Manoma, jog RAR α geno raiška normalios hemopoezės sąlygomis yra svarbi granulocitų diferenciacijai. Taip pat RAR α yra labai svarbus

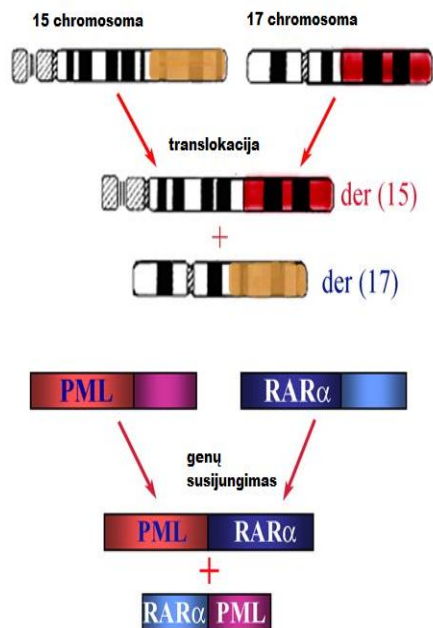
embrioninės kraujodaros metu [15]. Susidaręs PML-RAR α sukelia histonų deacetilimą. Deacetilinti histonai blokuoja genų, atsakingų už promielocito brendimą, transkripciją. Taigi mieloidinio kamienio ląstelės nustoja diferencijuoti ir į periferinę kraujotaką patenka pasiekusios tik promielocito stadiją (5 pav.) [29].



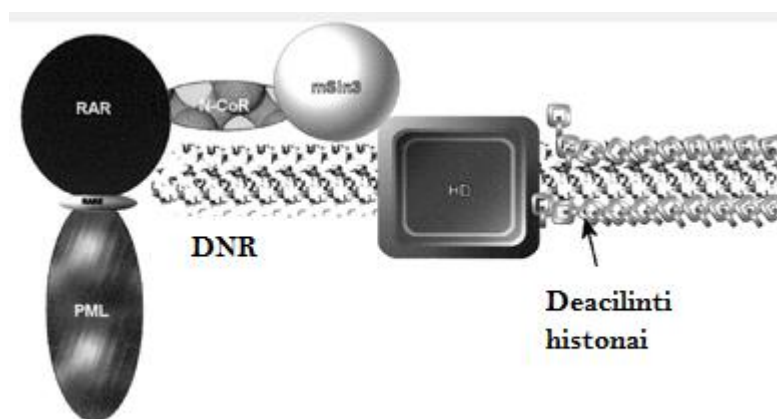
2 pav. Subalansuota reciprokinė translokacija $t(15;17)$ sergant ūmine promielocitine leukemija [41].



3 pav. Subalansuota reciprokinė PML ir RARA genų translokacija [41].



4 pav. Genų mutacijos ūminės promielocitinės leukemijos atveju [75].



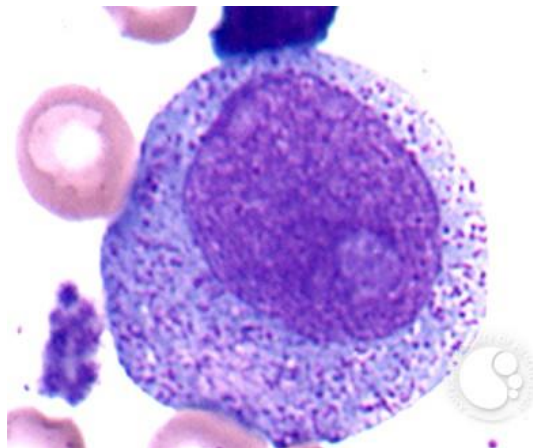
5 pav. Transkripcijos reguliacijos sutrikimas esant PML-RAR α mutantui [29].

Be šios mutacijos dar 30–40 proc. pacientų pasireiškia ir 8 chromosomų poros trisomija ar vienos iš 17 poros chromosomų izochromosomija [14]. Taigi be PML-RARA (BCR geno mutacijos) sukeltos translokacijos ūminės promielocitinės leukemijos atveju yra fiksuojamos FLT3 geno ir NPM1 genų mutacijos, neigiamai veikiančios hemopoezinių ląstelių vystymąsi. Mutavęs FLT3 genas sukelia taškinę mutaciją ir veikia ląstelių proliferaciją ją stabdydamas. Taip pat, mutavus šiam genui, yra mažinamas ląstelių išgyvenamumas [8]. Kai kurių mokslininkų teigimu, FLT3 mutacijos gali būti labiau būdingos M3v ūminės promielocitinės leukemijos variantui, nei įprastam M3 ūminės promielocitinės leukemijos variantui [69]. FLT3 ir NPM1

genų mutacijos nėra specifinės ūminei promielocitinei leukemijai [6]. Šie mutavę genai apskritai yra būdingi mieloidinės kilmės neoplazmų mutacijoms [30]. Vienų mokslininkų teigimu, šios papildomos chromosomų mutacijos neturi jokios įtakos ūminės promielocitinės leukemijos eigai ar būklės sunkumui [14], kitų mokslininkų tyrimų duomenimis, šios mutacijos siejamos su didesne nukraujavimo rizika, greitesne ligos eiga ir jaunesniu pacientų amžiumi [10]. Nepaisant to, kad nėra galutinai išaiškinta šių mutacijų reikšmė ligos eigai, jos yra svarbios parenkant gydymą [14].

1.3.2. Ūminės promielocitinės leukemijos morfologija

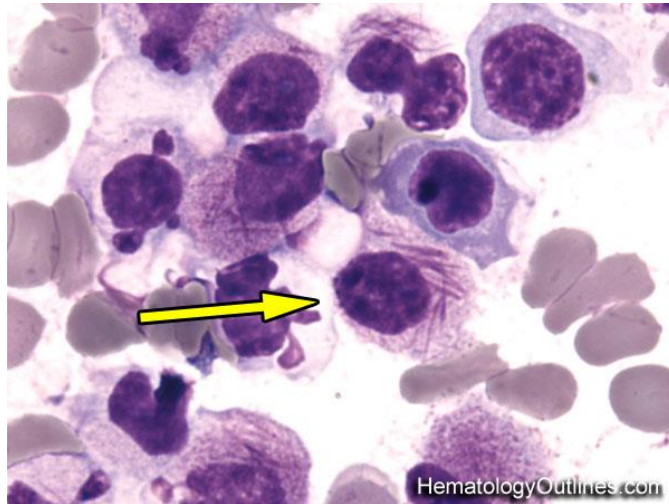
Promielocitinei ūminei leukemijai yra būdingi nepilnai subrendę ir diferencijavęsi promielocitai. Promielocitai šios leukemijos atveju yra sutinkami tiek periferiniame kraujyje, tiek kaulų čiulpuose. Promielocitais gali būti bazofiliniai, eozinofiliniai ar neutrofiliniai granulocitai. Normos atveju periferiniame kraujyje promielocitai neaptinkami [7].



6 pav. *Promielocitas* [43].

Promielocitinės ląstelės patologijos atveju išsiskiria savo dydžiu: jos yra didesnės už patologijos neturinčias nebrandžias kraujo ląsteles. Promielocitų dydis varijuoja nuo 12 iki 20 μ . Promielocitams būdinga gausi, gausiai grūdėta citoplazma, skiltėti branduoliai (6 pav.). Citoplazmoje randamos granulės kaupiasi mieloperoksidazės, rūgštinės fosfatazės ir esterazės fermentai, citoplazmoje gali būti stebimos vakuolės. Chromatinas branduoliuose netolygus, mažiau kondensuotas [51]. Citologiniuose preparatuose citoplazma dažosi mėlyna spalva, joje išryškėja tamsesnės spalvos grūdėliai. Branduolys nusidažo netolygiai, tačiau preparatuose galima pamatyti branduolėlį ir branduolio segmentaciją [51].

Tiriant ūminės promielocitinės leukemijos periferinio kraujo ar kaulų čiulpų tepinėlius, promielocitų citoplazmoje gali būti randamos ir Auerio lazdelės (Auer rods) [40].



7 pav. *Promielocitas su Auerio lazdelėmis citoplazmoje* [35].

7-tame paveikslėlyje matomos gausios Auerio lazdelių sankaupos promielocitų citoplazmose. Auerio lazdelės – tai susiliejusios lizosomų ar pirminių neutrofilų granulės, sudarytos iš lizosomų fermentų, peroksidazių ir didelių kristalinių intarpų. Auerio lazdelės promielocito citoplazmoje išsidėsto netvarkingai, jų dydis ir skaičius citoplazmoje nėra apibrėžtas. Auerio lazdelės yra būdingos 90 proc. promielocitų [78]. Promielocito citoplazmoje galima aptikti tiek vieną Auerio lazdele, tiek dideles jų sankaupas arba jų gali ir visai nebūti [32].

Ūminei promielocitinei leukemijai ypač būdinga trombocitopenija (trombocitų skaičiaus sumažėjimas kraujyje, galintis pasireikšti spontaniniu kraujavimu) ir diseminuotos intavazinės koaguliacijos sindromas (DIK) (cirkuliuojančio kraujo krešėjimas, kuomet susidaro daug agregatų ir krešulių, stabdančių organų kraujotaką). Trombocitų skaičių kraujyje mažina išaugęs patologinių ląstelių skaičius, kurių dalijimosi procesai užgožia normalių ląstelių dalijimosi procesus [68]. Taip pat promielocitine leukemija sergantiems individams dažnai pasireiškia blastų infiltracija į danteną, dantenų hipertrofija, dažni kraujavimai iš dantenų ar kitų vietų [37]. Kraujavimai vystosi ne tik dėl sumažėjusio trombocitų skaičiaus, bet ir dėl to, kad promielocitai išskiria medžiagas, skatinančias kraujavimą [68]. Ūmine promielocitine leukemija sergančio asmens kraujyje ilgėja protrombino laikas, mažėja fibrinogeno kiekis, didėja D-dimerų ir fibrino skilimų produktų kiekis [11]. Šiems procesams tęsiantis kraujavimai gali atsirasti ir kepenyse ar smegenyse, ir tai yra gana dažna mirties priežastis sergant ūmine promielocitine leukemija [16].

1.3.3. Ūminės promielocitinės leukemijos dignostikos metodai

Klinikiniai ūminės promielocitinės leukemijos požymiai: bendri negalavimo sutrikimai, pasireiškiantys karščiavimu, gali būti nustatomas blužnies ar kepenų padidėjimas, gausus ir sunkiai sustabdomas kraujavimas iš žaizdų, sutrikęs kraujo krešėjimas. Taip pat gali pasireikšti įvairūs kaulų bei sąnarių skausmai, bendras silpnumas [9]. Pasireiškus šiems simptomams pirmiausia atliekamas kraujo tyrimas. Kraujo tyrime promielocitinės leukemijos atveju stebimas eritrocitų ir trombocitų skaičiaus sumažėjimas, leukocitų skaičiaus padidėjimas. Diagnostikai tikslinti yra atliekama citocheminė mieloperoksidazės reakcija [54]. Mieloperoksidazė – fermentas, kuriam katalizuojant superoksido radikalas virsta hipochlorito rūgštimi. Šis fermentas yra specifinis mieloidinės kilmės ląstelių žymuo, kurio raiška pasireiškia tik vėlyvose blasto ar promielocitos stadijose ir brandžiuose neutrofiluose [48]. Taigi mieloperoksidazės reakcija rodo blastų kilmę: jei šios reakcijos rezultatas viršija 3 proc., diagnozuojama mieloidinė blastų kilmė. Ūminei promielocitinei leukemijai būdingos labai aukštos mieloperoksidazės reakcijos vertės: >80 proc., dažnai 99 proc. ar net 100 proc. [29]. Atlikus biocheminį kraujo tyrimą taip pat svarbu atsižvelgti ir į kraujo krešėjimo rodiklius. Sergant šia ūminės leukemijos forma dažnai pasitaiko kurio nors vieno ar kombinuotas kelių kraujo krešėjimo faktorių deficitas [29]. Ūminės promielocitinės leukemijos atvejui būdinga tai, kad paciento kraujyje yra padidėjusi šlapimo rūgšties koncentracija. Šlapimo rūgšties koncentracijos kraujyje padidėjimas yra greito ląstelių dauginimosi (irimo) pasekmė [38].

Identifikavus šiuos pakitimus bendrame ir biocheminiame kraujo tyrimuose atliekami pagrindiniai diagnostiniai tyrimai [38]:

- 1) Citomorfologinis tyrimas
- 2) Imunologinis tyrimas
- 3) Genetinis tyrimas

Citomorfologinis tyrimas. Tyrimo objektas – periferinio kraujo ar kaulų čiulpu ląstelės. Atliekama kraujo ląstelių dydžio, morfologijos ir skaičiaus tepinėlyje analizė. Stebimas promielocitų skaičius ir morfologija. Ūminė promielocitinė leukemija patvirtinama, jei citomorfologinio tyrimo metu nustatoma, kad promielocitų kiekis kraujyje sudaro ≥ 30 proc. promielocitinių ląstelių [38].

Imunologiniai tyrimai. Tyrimo objektas – molekulės, esančios ant kraujo ląstelių paviršiaus. Šis tyrimas pagal ląstelių ekspresuojamus žymenis leidžia atskirti ląstelių subrendimo stadiją ir kilmę, taigi ir ūminę mieloidinę leukemiją nuo ūminės limfoidinės leukemijos.

Identifikacijai naudojamas tėkmės citometrijos tyrimo metodas. Promielocitinė leukemija diagnozuojama pagal jai būdingus mieloidinės kilmės žymenis ant kraujo ląstelių [25].

Genetinis tyrimas. Dažniausiai diagnozei patvirtinti ar paneigti yra taikomi citogenetiniai tyrimo metodai. Sudarytame paciento kariotipe stebima chromosomų struktūros patologija – translokacija tarp 15 ir 17 chromosomų. Atliekant molekulinės genetikos tyrimus (polimerazės grandininę reakciją) ieškomos mutacijos genuose, lemiančiuose ūminės promielocitinės leukemijos formavimąsi organizme [38].

1.4. Hemopoezinių ląstelių žymenys

Vėžio žymenys – tai medžiagos (dažniausiai baltyminės kilmės), esančios audiniuose, kraujyje, kituose organizmo skysčiuose, ir susijusios su vėžiniu procesu. Vėžio žymenų yra aptinkami kiekvienoje ląstelėje ir nesant patologinei būklei. Tačiau, prasidėjus kancerogeniniam procesui, vėžio žymenų produkcija žymiai išauga. Vėžio žymenys aptinkami daugelyje organizmo skyčių: kraujyje, šlapime, navikinių audinių skysčiuose ar kituose organizmo skysčiuose, taip pat jų galima aptikti ir išmatose [55]. Vėžio žymenų ištyrimas ir identifikavimas naudojami vėžio diagnostikoje. Vėžio žymenys gali būti susiję su pačia vėžine ląstele arba atsiranda kaip atsakas į vėžinį procesą organizme [37].

Kiekviena hemopoezės ląstelė yra skirtinga ir savita, pasižyminti skirtingais biologiniais žymenimis, todėl, norint nustatyti kraujodaros hemopoezines ląsteles ir identifikuoti kraujodaros patologijas, svarbu žinoti hemopoezinių ląstelių žymenis. Dažniausiai hemopoezinėms ląstelėms tirti yra naudojami monokloniniai antikūnai [50]. Atliekant tėkmės citometrijos tyrimus ūminei promielocitinei leukemijai identifikuoti naudojama daug ląstelių žymenų, tačiau HLA-DR, CD15, CD33, CD34, CD117 yra svarbiausi žymenys ūminės promielocitinės leukemijos identifikavimui. Be šių žymenų, tiriant ūminės promielocitinės leukemijos pacientų kraują ar kaulų čiulpus, taip pat svarbu atkreipti dėmesį į CD2, CD13, CD56, CD64 žymenų raišką [40].

3 lentelė. Ūminei promielocitinei leukemijai būdingi žymenys [40;2;62].

CD žymuo	CD žymens aprašymas
CD 2	Leukocitų funkcijos antigenas, limfinės kilmės ląstelių žymuo, ekspresuojamas daugiausiai T limfocitų.
CD 13	Mieloidinės kilmės žymuo, artimas CD 33 žymeniui. Žymuo aptinkamas esant ne tik leukemijoms, bet ir kitiems vėžiniams procesams organizme. Tarpininkauja naviko angiogenezėje, dalyvauja daugelyje fermentų skaldymo reakcijų.
CD 15	Ląstelių paviršiaus glikoproteinas, tarpininkaujantis ląstelių fagocitozėje ir chemotaksyje. Žymenį ekspresuoja neutrofilai.
CD 33	Mieloidinės kilmės ląstelių transmembraninis receptorių
CD 34	Tai ląstelių paviršiaus glikoproteinas. Tai pirmasis ir plačiausiai naudojamas hemopoezinių kaimenių ląstelių žymuo - tarpląstelinės adhezijos faktorius. CD 34 yra viengrandis transmembraninis baltymas, kurio raiška vyksta embriono fibroblastuose, nesubrendusiose hemopoezinėse ląstelėse bei kraujodaros pirmtakų ląstelėse
CD 56	Glikoproteinas, natūraliųjų kilių paviršiaus antikūnas, atsakingas už ląstelių adheziją.
CD 64	Membranos integralinis glikoproteinas, jaunų mieloidinės kilmės ląstelių žymuo. Taip pat brandžių antigenų pateikiančių ląstelių: dendritinių ląstelių, makrofagų, monocitų žymuo.
CD 117	Kamieninių ląstelių augimo faktoriaus receptorių. Tai tirozinkinazės baltymas, vadinamas KIT genu. Normos atveju šis baltymas nėra gausiai ekspresuojamas ląstelių paviršiuje, padidėjusi šio žymes raiška leidžia daryti prielaidą apie organizme vykstantį kancerogeninį procesą

1.5. Ūminės promielocitinės leukemijos gydymas

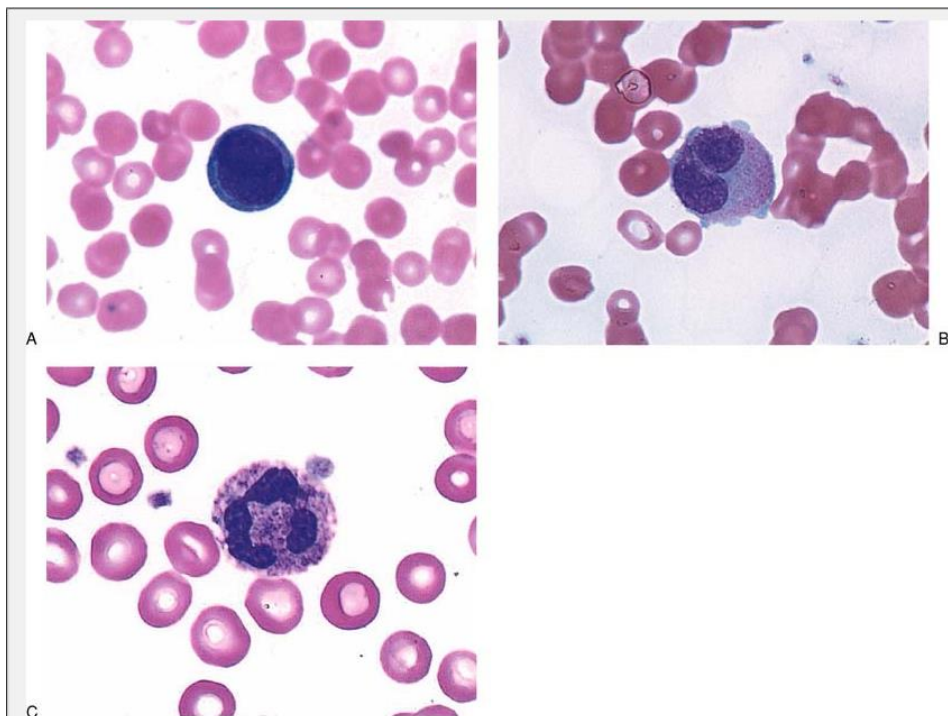
Ūminė promielocitinė leukemija yra gydoma šiais metodais [27]:

- Chemoterapija
- Kamieninių ląstelių transplantacija
- Gydymas arseno trioksidu arba ATRA
- Antikūnų terapija.

Dažniausiai ūmine promielocitine leukemija sergantiems pacientams yra taikoma chemoterapija. Taikant chemoterapiją yra sunaikinamos vėžinės ląstelės arba sustabdomas vėžinių ląstelių dalijimasis. Chemoterapijos metu naudojamos tokios veikliosios medžiagos ir vaistai kaip antraciklinas, citarabinas, hidroksikarbamidas, prednizolonas ar 6-tioguaninas [59]. Pirmajame chemoterapijos etape (indukcijos terapija) naudojant vaistines medžiagas siekiama iš kraujo bei kaulų čiulpų pašalinti vėžines ląsteles. Po indukcijos terapijos taikoma post-remisijos terapija, kurios metu kovojama su po indukcijos terapijos dar likusiomis vėžinėmis kraujo ląstelėmis organizme. Jei liga pasiekia remisiją, skiriamas konsolidacijos etapas, kuomet ligoniui skiriami intensyvūs chemoterapijos kursai. Taip siekiama prailginti remisijos laiką iki recidyvo arba visiškai jo išvengti [27]. Kai ūminė promielocitinė leukemija sunkiai pasiduoda gydymui, tuomet yra taikoma kamieninių ląstelių transplantacija. Prieš kaulų čiulpų transplantaciją vykdant ypač intensyvią chemoterapiją ar taikant radiologinį gydymą yra pašalinamos tiek sveikos kaulų čiulpų ląstelės, tiek patogeninės. Tuomet ligoniui persodinami sveiki kaulų čiulpai [27].

Gydymas arseno trioksidu (ATO) arba ATRA (all-trans-retinoic acid) yra vienas specifiskiausių ūminės promielocitinės leukemijos gydymo metodų. ATRA (all-trans retinoinė rūgštis) arba arseno trioksidas inicijuoja vėžinių kraujo ląstelių apoptozę kaulų čiulpuose. ATRA ir ATO tiesiogiai veikia molekulinį ligos vystymosi mechanizmą, naikindamas molekulinę mutaciją. Tai gana efektyvus gydymo metodas, kadangi jau po 4-6 savaičių yra matomi ligos gydymo rezultatai [29]. Pirmasis požymis, rodantis, kad gydymas yra efektyvus – mažėjanti koagulopatija. Po 4-6 savaičių, pacientą gydant ATRA ar ATO, jo kraujyje stebimas žymus blastų skaičiaus sumažėjimas: blastų turėtų būti randama <5 proc., promielocitų citoplazmoje neturėtų būti stebimos Auerio lazdelės, periferiniame kraujyje turėtų daugėti neutrofilų skaičius ($\geq 1.5 \times 10^9/l$), pasikeitęs trombocitų skaičius ($>100 \times 10^9/L$) [29]. Nepaisant pagerėjusių hematologinių rodiklių, pacientas turėtų būti gydomas ATRA ar ATO dar 4 savaites. 8-tame paveikslėlyje galima stebėti gydymo ATRA arba ATO efektyvumą: A dalyje matomas

promielocitas periferinio kraujo tepinėlyje prieš pradedant gydymą ATRA arba ATO preparatais. Tai piktybinės ląstelės (didesnės nei įprasti promielocitai), ląstelių citoplazmoje gausu granulių, dengiančių branduolį, todėl branduolio ribos tampa neaiškios. Branduoliai netaisyklingos formos, iškraipyti ar sulankstyti [29]. Be granulių citoplazmoje stebimos Auerio lazdelės, galinčios burtis į stambesnes grupes ir sudaryti darinius, vadinamus „faggot cells“. B dalyje matomas promielocitas, kuris jau paveiktas gydymo arseno trioksido ar trans-retinoinės rūgšties preparatais: galima stebėti branduolio pokyčius – branduolys pradeda segmentuotis. Taip pat stebimi pokyčiai ląstelės citoplazmoje: ji šviesesnė nei patologinio promielocito prieš pradedant gydymą, citoplazmoje matoma granulių, būdingų granulocitui – brandesnei ląstelei už promielocitą. C paveikslėlio dalyje matoma kraujo ląstelė, paciento gydomo jau 30 dienų: ląstelė įgauna granulocitui būdingus požymius, rodančius, kad promielocituose nebėra stabdomas mieloidinis brendimas [29]. Nepaisant gerų gydymo rezultatų, gydymas šiais preparatais yra efektyvus tik tiems ligoniams, kurie turi 15 ir 17 chromosomų translokacijas. Pacientams, kurių ūminės promielocitinės leukemijos kilmė nėra nulemta genetiškai, dažniausiai taikomas kaulų čiulpų persodinimas [29].



8 pav. Gydymo ATRA ir ATO rezultatai [29]

2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimų metodai

2.1.1. Tėkmės citometrijos tyrimo principai

Tėkmės citometrija (angl. *flow cytometry*; *flow* – srautas, srovė, tėkmė; *cytometry* – ląstelės matavimas) – dalelių analizavimo technologija. Ši dalelių analizavimo technologija ląstelių tyrimams naudoja imunoglobulinų biologijos ir fluorescencinių medžiagų chemijos principus, taip pat laminarinio skysčio tekėjimo ir šviesos optinės sklaidos principus [50]. Tėkmės citometrijos tyrimo metodas atsirado siekiant padidinti morfologinio ląstelių tyrimo metodo mikroskopu efektyvumą ir tikslumą, sumažinti tyrimo subjektyvumą. Taikant tėkmės citometrą, pagreitinamas tyrimo laikas: tėkmės citometras per sekundę geba iširti 70 000 dalelių, o informacija greitai apdorojama ir pateikiama operatoriui suprantama forma. Analizuojant ląsteles tėkmės citometru, galima gauti ir kiekybinę (nustatomas absoliutus ląstelių skaičius; apskaičiuojama procentinė ląstelių sudėtis; nustatomas norimų ląstelės paviršiaus žymenų raiškos intensyvumas), ir kokybinę informaciją apie dominančias ląsteles: nustatomos skirtingo dydžio ląstelių populiacijos; nustatytos ląstelių populiacijos gali būti klasifikuojamos pagal ląstelių dydį, ar pagal žymenis, kuriuos jos ekspresuoja [12]. Tėkmės citometras taip pat leidžia tyrėjui įvertinti ląstelės ar jos branduolio skersmenį, ląstelės vidinę struktūrą, membranos potencialą, ląstelės paviršiaus plotą bei tūrį. Naudojant įvairius reagentus tėkmės citometru galima įvertinti dar daugiau parametru: branduolio, citoplazmos ar paviršiaus antigenus, DNR, RNR, chromosomas, fermentus, lipidus, baltymus ar hormonus [50].

Tėkmės citometras analizuoja molekulinės dalelės tėkmėje. Jo veikimas yra pagrįstas keliais principais:

a) elektroninės informatikos. Šio principo esmė – šviesos signalų vertimas elektroniniais. Perduoti signalai yra stiprinami, kad vyktų tikslesnis kompiuterinis jų apdorojimas ir pateikimas į kompiuterinę sistemą;

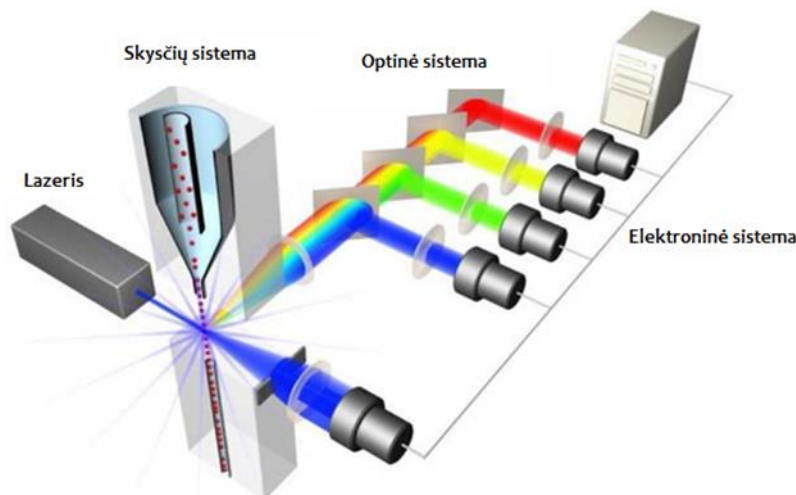
b) skysčių dinamikos – šis principas remiasi Bernoulli efektu, laminariosios srovės tekėjimu, bei akustiniais ar hidrodinaminiais fokusavimais. Dėl skysčių dinamikos principo ląstelės išsirikiuoja viena paskui kitą dar prieš kertant lazerio spidnulį. Skysčių dinamikos principas užtikrinamas tėkmės citometro skysčių ir slėgio sistemos.

c) šviesos dinamikos bei optinio matavimo principu - monochrominė lazerio šviesos sklaida (kurios dėka galima įvertinti ląstelės dydį, pagal priekinės šviesos sklaidą ir grūdėtumą –

pagal šoninės šviesos sklaidą), fluorochromų sužadimas ir skirtingų ilgių šviesos ekscitacija ir emisija (dėka emisijos monochrominė lazerio šviesa gali vienu metu sužadinti skirtingus fluorochromus, taip gaunant informaciją apie keletą ląstelės požymių) [49].

Šiuolaikinį tėkmės citometrą sudaro (9 pav.) :

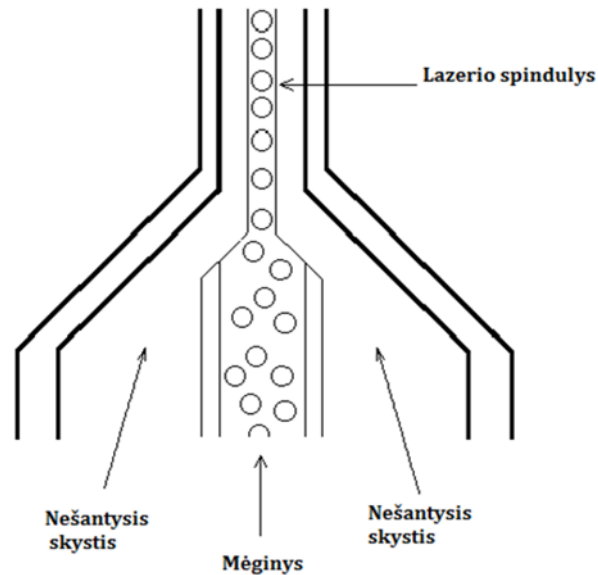
- 1) Šviesos šaltinis (dažniausiai lazeris, skleidžiantis ta tikro bangos ilgio šviesą) bei optinio signalo pasiskirstymo ir surinkimo sistema;
- 2) Skysčių sistema su tėkmės kamera, kurioje dalelės akustinio arba hidrodinaminio fokusavimo būdu yra išrikiuojamos viena paskui kitą;
- 3) Elektroninė šviesos signalo stiprinimo, skaitmeninio ir apdorojimo sistema;
- 4) Duomenų analizės ir grafinio vaizdavimo sistema [64].



9 pav. Tėkmės citometro schema [63]

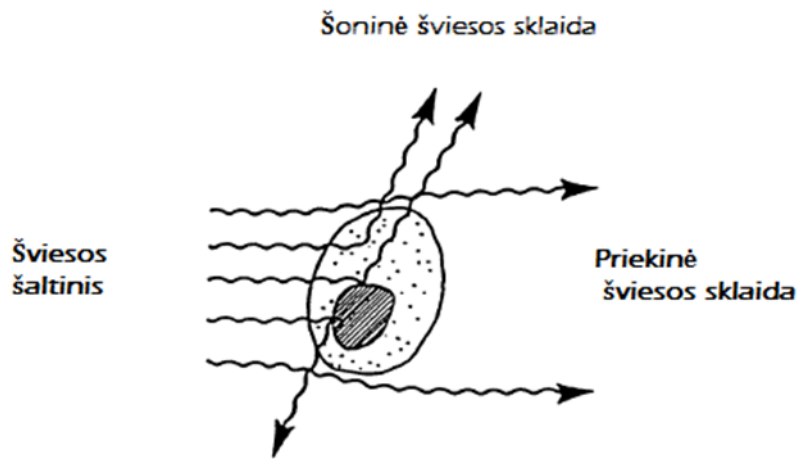
Tėkmės citometrijoje mėginys gali būti fokusuojamas dviem būdais: akustiniu arba hidrodinamiu būdu. Fokusuojant mėginį akustiniu būdu naudojamas pjezoelektrinis garso generatorius. Generatorius išrikiuoja daleles nepriklausomai nuo skysčio nešėjo srovės skersmens bei greičio [36]. Dėl tokių fokusavimo galimybių tėkmės kamera tėkmės citometre gali būti ir paprastas stiklo kapiliaras, tačiau taip pat galima tirti ir mažos koncentracijos mėginius [49]. Hidrodinaminio fokusavimo atveju (10 pav.) mėginys yra švirksčiamas į vidurį nešančiojo izotoninio skysčio srovės, taip mėginys susifokusuoja srovės viduryje, o laminarus srovės tekėjimas apsaugo daleles nuo turbulencijos. Tiriant mėginius tėkmės citometru, svarbu pasirinkti tinkamą srovės greitį, nes didėjant srovės greičiui didėja ir ląstelių sangrūdos tikimybė bei turbulentinės tėkmės rizika. Pasirinkus tinkamą srovės tėkmės greitį suspensijoje esančios

ląstelės rikiuojasi eilute viena už kitos ir tekėdamos srove kerta šviesos spindulį po vieną. Taip yra nustatomi kiekvienos atskiros ląstelės parametrai [49].



10 pav. Hidrodinaminio fokusavimo schema [63]

Dalelių matavimui tėkmės citometre užtikrinti yra įrengtas šviesos šaltinis (lazeriai ar UV lempos), kurį kerta vorele išsidėsčiusios tiriamosios dalelės. Dalelės, priklausomai nuo jų paviršiaus ir vidaus struktūrų sudėtingumo bei dydžio, į skirtingas puses išsklaido šviesos spindulį 90° ar 180° kampu. Kartu yra sužadinami ant ląstelės prisitvirtinę fluorochromai, išspinduliuojantys skirtingo ilgio bangos šviesą [47]. Išsklaidytą šviesos spindulį surenka ir jo stiprumą užfiksuoja šoninės sklaidos (ŠŠS) bei priekinės sklaidos (PŠS) detektoriai, signalą paversdami elektroniniu. Dalelių išspinduliuotą fluorescencinės sklaidos šviesą fiksuoja fluorescencinės šviesos sklaidos detektoriai (FL) [46]. Priekinė šviesos sklaida atspindi ląstelės dydį: kuo didesnė ląstelė, tuo ji ilgiau užstos lazerio spindulį. Kuomet šviesa lūžta pataikiusi į vidines skaidrias ląstelės struktūras, ji yra atmušama 90° kampu – tai šoninė šviesos sklaida, atspindinti ląstelės grūdėtumą [46].



11 pav. Šoninė ir priekinė šviesos sklaida [63]

Lazerio ar fluorochromų atspindėtos šviesos signalas gali būti stiprinamas elektriniais fotodaugintuvais, jei jis yra silpnas. Dažniausiai silpniausi yra stačiu kampu išspinduliuoti šviesos signalai. Stiprūs atspindėti signalai vėliau yra siunčiami į analoginio-skaitmeninio signalo keitiklį. Analoginio-skaitmeninio signalo keitiklis paverčia atspindėtą signalą kompiuteriui suprantamu skaitmeniniu pavidalu [49]. Signalo apdorojimas yra valdomas specialia kompiuterine programine įranga. Programinė įranga gautus duomenis gali pavaizduoti grafiškai keliais būdais: biekspontine diagrama, bivariacine diagrama (kontūrine, tankio, taškine), dažnio histograma ar trimatė diagrama [50].

Tėkmės citometrijoje analizei atlikti naudojami fluorescuojantys junginiai (fluorochromai, fluoroforai, fluorescuojantys molekuliniai zondai). Šie junginiai padeda vizualizuoti ląstelių išorės ir vidaus struktūras. Pagrindinė jų savybė – išspinduliuoti didesnio bangos ilgio šviesą po sužadavimo mažesnio bangos ilgio monochromine šviesa [61]. Kiekvienas fluorochromas turi savo specifinį ir tik jam unikalų sužadavimo šviesos bangos ilgį bei išspinduliuotos šviesos bangos ilgį. Taigi vienus fluorochromus galima sužadinti tik, pavyzdžiui, mėlynu ar raudonu lazeriu, kitus – tik ultravioletiniais spinduliais ir t.t. Analizuojant mėginį tėkmės citometrijos metodu svarbu fluorochromus parinkti taip, kad jų išspinduliuojami šviesos spektrai būtų kuo toliau vienas kito, tam, kad šviesos signalai nesusiklotų vienas su kitu [49].

2.1.2. Tyrimas automatizuotu hematologiniu analizatoriumi

Automatizuotas kraujo tyrimas – informatyvus tyrimas, suteikiantis pradinę informaciją apie kraujo elementų pakitimus periferiniame kraujyje. Šis tyrimas suteikia informacijos apie visų kraujo kamieninių ląstelių būklę kaulų čiulpuose. Automatizuoto kraujo tyrimo metu yra nustatomi absoliutūs leukocitų, eritrocitų, trombocitų skaičiai kraujyje, taip pat įvertinamas santykinis šių kraujo komponentų kiekis [29]. Automatizuoti hematologiniai analizatoriai taip pat geba išskirti eritrocitų rodiklius (MCV – vidutinį eritrocitų tūrį, MCH – vidutinį eritrocitų hemoglobino kiekį, MCHC – vidutinę eritrocitų hemoglobino koncentraciją, RDW – eritrocitų dydžio variaciją), taip pat apskaičiuoti hemoglobino ir hematokrito koncentracijas periferiniame kraujyje. Automatizuoti hematologiniai analizatoriai leukocitų skaičių taip pat išskiria į smulkesnes grupes, priklausomai nuo to, kelių dalių leukogramą skaičiuoja analizatorius (trijų ar penkių dalių leukogramos) [29].

Trijų dalių leukogramoje leukocitai yra išskiriami į šias grupes: maži (limfocitai), vidutiniai (bazofilai, eozinofilai, monocitai) bei didelės (granulocitai). Tuo tarpu penkių dalių analizatorius leukocitus atskiria į 5 grupes: neutrofilus, bazofilus, eozinofilus, limfocitus, monocitus. Taip pat analizatoriai geba atskirti ir nebrandžias kraujo ląsteles, priskirdami jas į atskirą IG (immature granulocytes) grupę [29]. Modernūs hematologiniai analizatoriai patologijos atveju atsakyme pateikia įspėjimus apie kraujo ląstelių nukrypimus nuo normų. Tokiu atveju automatizuoto hematologinio analizatoriaus duoti įspėjimai apie galimai patologines kraujo ląsteles turi būti tikrinami citologiniu periferinio kraujo ar kaulų čiulpu tepinėliu [70].

Hematologiniai analizatoriai remiasi dviem analizės principais: elektrine varža (impedansas) bei šviesos-optine sklaida. Automatizuotame hematologiniame analizatoriuje, kaip ir tėkmės citometre, ląstelių analizė atliekama taikant hidrodinaminę ląstelių srauto fokusavimą [29].

2.1.3. Mėginių ruošimo tyrimams metodika

Analizei tėkmės citometru mėginiai ruošti Lysing reagentu lizuojant kraują pagal metodiką LWB (angl. *lysed whole blood*).

1. Tiriamieji mėgintuvėliai pažymimi taip, kad būtų galima identifikuoti pacientą.
 2. Į pažymėtą mėgintuvėlį dedama po 20 µl monokloninių antikūnų, kurie konjuguoti su fluorochromais.
 3. Į tuos pačius mėgintuvėlius automatizuota pipete įlašinama 100 µl kraujo.
 4. Mėgintuvėliuose esantis kraujo ir antikūnų mišinys yra sumaišomas sukūriniu purtykle žemu dažniu 3 sekundes ir inkubuojamas kambario temperatūroje 20 minučių tamsoje.
 5. Praėjus inkubacijos laikui įpilami 2 ml lizuojančio tirpalo (FACS – Lysing Solution, Becton – Dickinson, JAV), mėginys dar kartą sumaišomas sukūriniu purtykle 3 sekundes žemu dažniu ir inkubuojamas kambario temperatūroje 10 minučių – taip eritrocitai lizuojami iš mėginio.
 6. Praėjus 10 minučių po inkubacijos, mėgintuvėlis vėl centrifuguojamas 5 min 500xg režimu kambario temperatūroje.
 7. Mėgintuvėlį centrifūgavus nupilamas supernatantas, paliekama apie 50 µl skysčio. Susidariusios nuosėdos suspenduojamos buferyje.
 8. Į mėgintuvėlius pridedama 2 ml fosfatinio buferio fiziologinio tirpalo, 3 sekundes maišoma žemu dažniu sukūriniu purtykle.
 9. Sumaišius vėl centrifūguojama 300xg kambario temperatūroje 5 minutes.
 10. Susidaręs supernatantas nusiurbimas ir išpilamas paliekant apie 500 µl skysčio.
 11. Galiausiai pridedama 500 µl 0,5 % fiksuojančio paraformaldehido tirpalo, po to sumaišoma sukūriniu purtykle žemu dažniu 3 sekundes.
 12. Paruošti mėginiai analizuojami tėkmės citometru.
- Jei mėginys analizuojamas ne iš karto, jis laikomas tamsoje 2-8 °C temperatūroje, tačiau mėginius būtina išanalizuoti per 24 valandas.

Ėminiai, kurie analizuojami tėkmės citometru, turi atitikti tam tikrus reikalavimus:

- Jei analizuojamas veninis kraujas – jis turi būti paimtas standartinės venos punkcijos būdu, naudojant vakuuminį mėgintuvėlį su K₂ arba K₂EDTA antikoaguliantu. Jei analizuojami, kaulų čiulpai, jie turi būti renkami į tokius pačius mėgintuvėlius standartinės kaulų čiulpų punkcijos metu.

- Visi ėminiai privalo būti be krešulių, veninio kraujo mėginiai privalo būti paimti iki žymos, esančios ant vakuuminio mėgintuvėlio. Jei analizei naudojami kaulų čiulpai, jų turi būti paimt ne mažiau 1 ml.

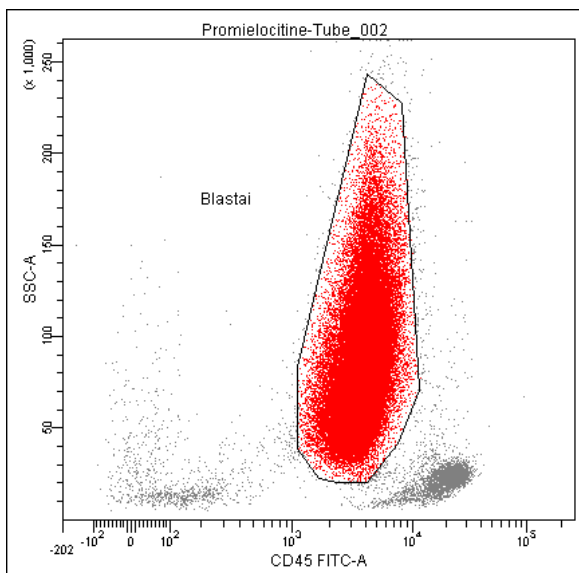
Prieš analizuojant mėginius tėkmės citometru turi būti atlikta tyrimo kokybės kontrolė. Kokybės kontrolė atliekama kasdien, prieš pradėdant darbą su tėkmės citometru. Kokybės kontrolei naudojamas BD Multi-Check Control rinkinys. Šis rinkinys yra stabilizuota, kraujo pagrindu pagaminta, kontrolinė medžiaga, kurioje yra žinomos leukocitų subpopuliacijų žymenų raiškos vertės. Kokybės kontrolės mėginiai paruošiami kaip ir tiriamoji medžiaga, analizuojant tėkmės citometru nustatomi CD3+CD4+ ir CD3+CD8+ limfocitų subpopuliacijų procentiniai dydžiai. Gauti rezultatai palyginami su reikšmėmis, aprašytomis kontrolinės medžiagos apraše. Jei rezultatai yra nurodytose ribose – kontrolė atlikta sėkmingai. Jei kokybės kontrolės rezultatai neatitinka nurodytų aprašuose, ieškoma to priežastis ir ją pašalinus kartojamas kokybės kontrolės tyrimas.

Kuomet kokybės kontrolė atitinka aprašytas ribas, galima analizuoti mėginius. Prieš paleidžiant mėginį tėkmės citometrijos tyrimui, sukuriama nauja duomenų rinkimo ir analizės forma, pasirenkamas reikiamas mėgintuvėlių skaičius, įrašomi tiriami žymenys. Taip pat nurodoma, kiek ląstelių reikalinga tirti: 100 000 esant 5–20 proc. blastų ir 50 000 esant ≥ 20 proc. blastų. Kartu nurodomas ir vidutinis ląstelių rinkimo greitis. Prieš dedant mėginį ant aspiracinės tėkmės citometro adatos, jis dar kartą sumaišomas sūkurine purtykle. Tėkmės citometrui surinkus reikiamą ląstelių kiekį, mėgintuvėlis išimamas.

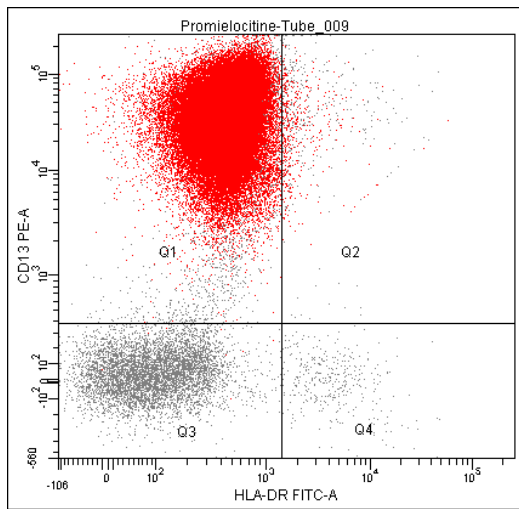
Šio tyrimo metu FASCanto (BD, JAV) tėkmės citometru (12 pav.) analizuoti šie žymenys: CD2, CD13, CD15, CD33, CD34, CD56, CD64, CD117 ir cMPO. Taip pat tėkmės citometru buvo tirta ir įvertinta ląstelių populiacijos šoninė šviesos sklaida (ŠŠC). Duomenys analizuoti naudojant FASCDiva v.6.1 programinę įrangą. Šoninės sklaidos ir žymenų raiškos reikšmės buvo įvertintos geituojant susidariusias ląstelių populiacijas. Vėliau tiriami įvairių žymenų raiška apibrėžtoje ląstelių populiacijoje iš populiacijos pašalinus mirusias ląsteles, šiukšles (13 pav.)



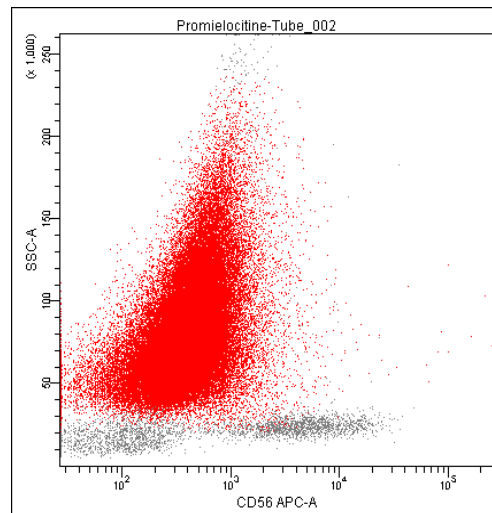
12 pav. *FASCanto (BD, JAV) tėkmės citometras*



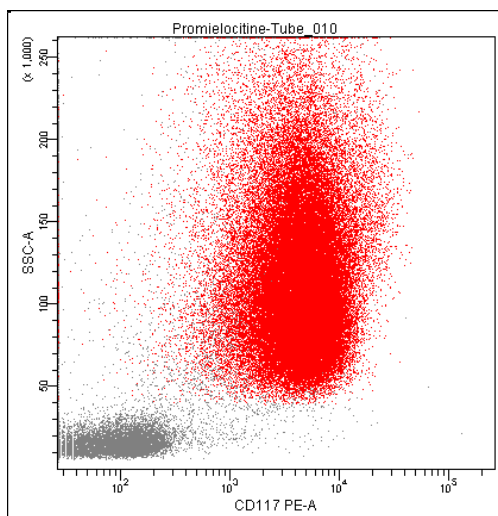
13 pav. *Blastų populiacijos atskyrimas*



A



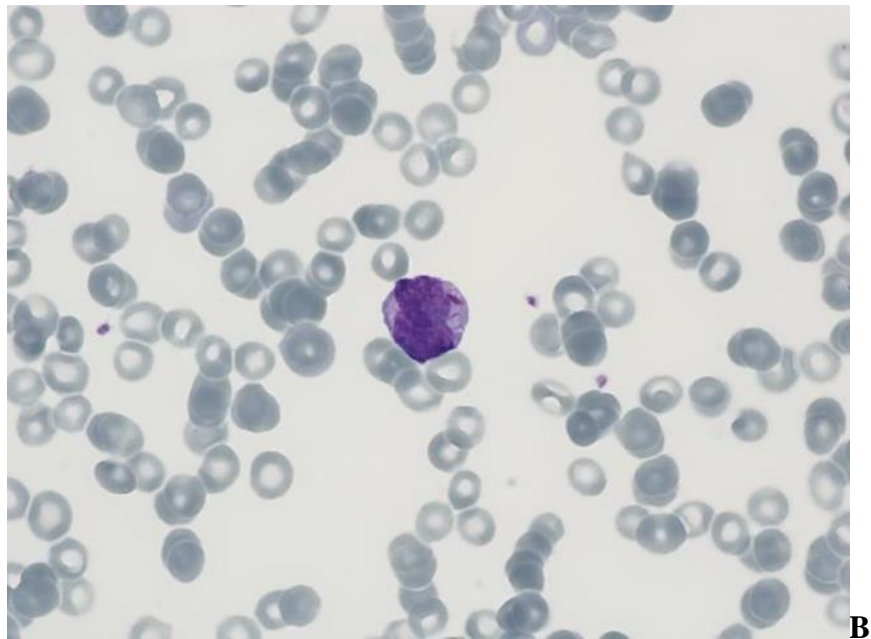
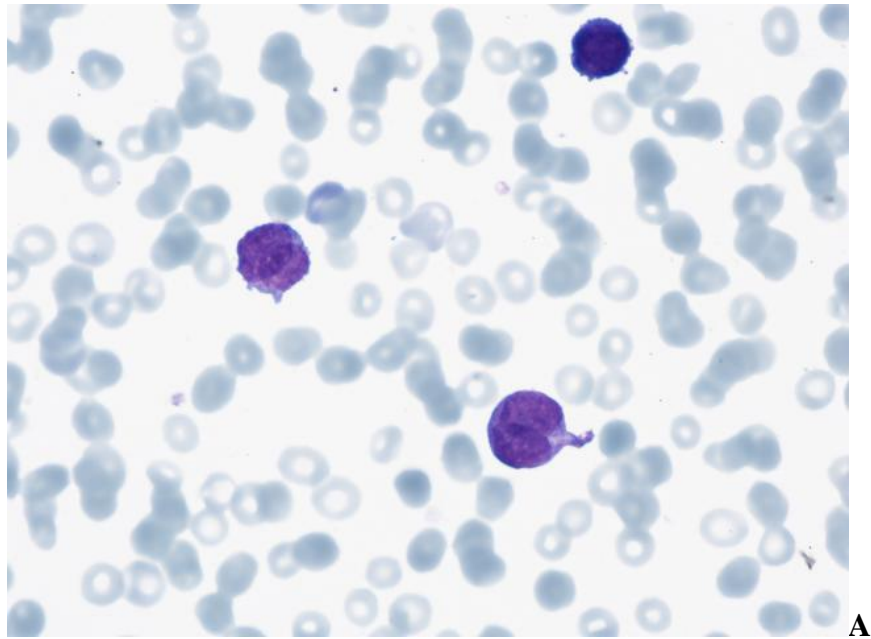
B



C

14 pav. Žymenų raiškos intensyvumo įvertinimas

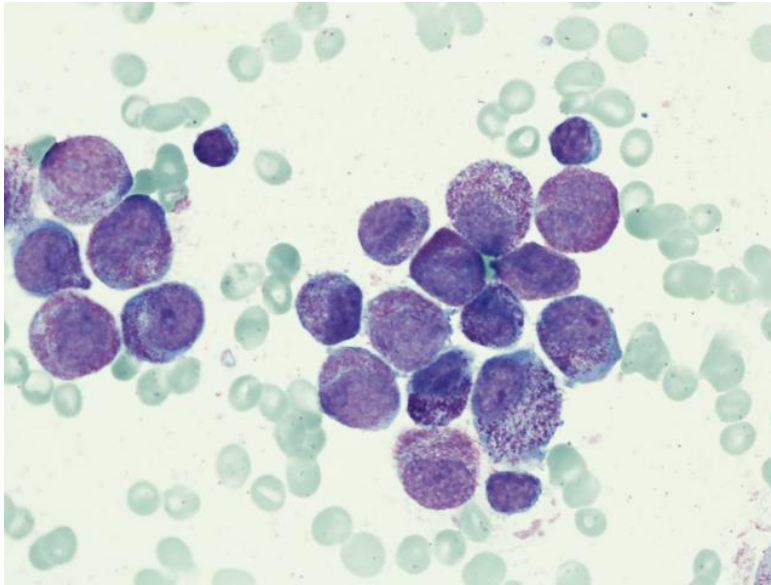
14-ame paveikslėlyje vaizduojamas žymenų raiškos vertinimas ląstelių populiacijoje. A paveikslėlio dalyje matoma, kad blastams būdinga CD 13 žymens raiška (blastų populiacija matoma Q1 dalyje), tačiau jie nelinekę ekspresuoti HLA-DR žymens. B dalyje stebima taip pat neigiama CD 56 žymens raiška, o C dalyje jau matoma, kad blastai ekspresuoja CD 117 žymenį.



15 pav. *Paciento X blastai, atitinkantys ūminės promielocitinės leukemijos morfologiją*

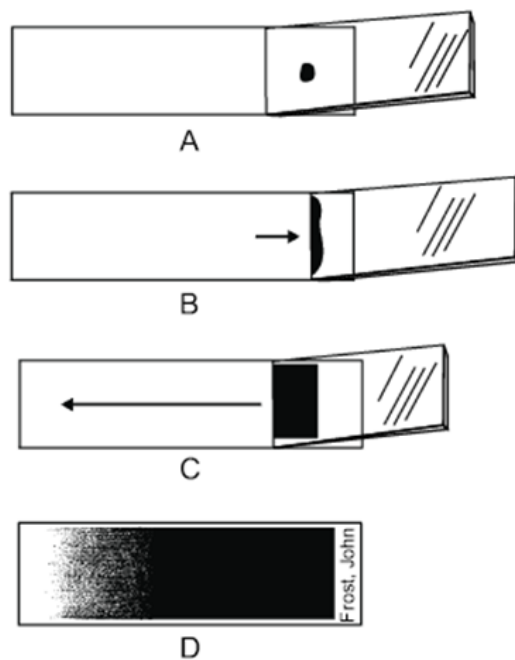
Citologinė kaulų čiulpų ar periferinio kraujo tepinėlių analizė buvo atlikta Nikon (Japonija) šviesiniu mikroskopu Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Tėkmės citometrijos laboratorijoje naudojant 100x padidinimą. Atliekant citologinį tyrimą buvo vertinta blastų morfologija (ar blastai atitinka promielocito morfologiją), Auerio lazdelės, citoplazmos grūdėtumas. 15-to paveikslėlio A dalyje matomas promielocitas, atitinkantis ūminės promielocitinės leukemijos morfologiją: didelis, skiltėtas branduolys, pakitęs branduolio ir citoplazmos santykis. B dalyje promielocito citoplazmoje galima stebėti pavienes Auerio

lazdeles. 16-tame paveikslėlyje matomos blastų sankaupos, gausiai grūdėta citoplazma su Auerio lazdelių sankaupomis.



16 pav. Paciento X periferinio kraujo tepinėlyje identifikuota promielocitų su gausiai grūdėtomis citoplazmomis ir Auerio lazdelėmis sankaupa

Citomorfologiniam tyrimui skirti tepinėliai ruošiami ant švaraus ir sauso objekcinio stiklelio (17 pav.). Lašas kraujo yra užlašinamas 1–1,5 cm atstumu nuo stiklelio krašto. Po to šiek tiek į priekį nuo kraujo lašo reikia priglausti stiklelį su šlifuotais kraštais: stiklelis šlifuotais kraštais palenkiamas taip, kad su objekciniu stikleliu sudarytų 40–45° kampą. Kuomet kraujo lašas pasklinda po visą šlifuoto stiklelio briaunos ilgį, šlifuotu stikleliu staigiu judesiu perbraukiamas į priekį, paliekant maždaug 1 ar 1,5 cm iki objekcinio stiklelio galo. Vėliau kraujo tepinėlis džiovinamas kambario temperatūroje. Išdžiovinintas tepinėlis dažniausiai dažomas Romanovskio modifikuotu dažymo būdu. Užfiksuoti hematologiniai ar kaulų čiulpų preparatai įdedami į dažymui skirtus indus, juos užpylus 5% Romanovskio-Gimzos dažais. Tuomet preparatai dažuose laikomi 40-60 minučių, jiems nusidažius yra skalaujami po silpna vandens srove ir išdžiovinami. Vėliau išdžiovinintas ir nuskalautas Romanovskio-Gimza dažais nudažytas tepinėlis dažomas kristalo violetu nuo 10 iki 30 minučių. Nudažytas kristalo violetu preparatas vėl nuskalaujamas ir išdžiovinamas. Taip paruoštas preparatas turi būti ištirtas iki 3 savaičių, kadangi vėliau jis pradeda blukti. Išblukusį preparatą galima dar kartą dažyti kristalo violetu.



17 pav. Kraujo tepinėlio paruošimas [26].

Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje kraujas buvo tiriamas automatizuoto kraujo analizatoriumi Cell-Dyn (Abbott, JAV). Hematologiniu analizatoriumi buvo įvertinti šie kraujo rodikliai: leukocitų, trombocitų skaičius, hemoglobino koncentracija kraujyje ir blastų kiekis.

Pacientų periferinis kraujas ir kaulų čiulpų tiriamoji medžiaga buvo imta į vakuuminius Vacutainer (BD, JAV) mėgintuvėlius violetiniais kamšteliais (su EDTA antikoaguliantu). Tyrimams paimti ir paruošti mėginiai ištirti nedelsiant, per 4 valandas, laikyti kambario temperatūroje.

Molekulinė kraujo ar kaulų čiulpų analizė buvo atlikta Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Molekulinės medicinos laboratorijoje. Naudotas PGR metodas, dauginant BCR, NPM1 ir FLT3 mutavusių genų grandines.

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojantis Microsoft Office 2010, Exel operacine ir STATGRAPHICS Centurion XVI Version 16.2.04, IBM SPSS STATISTICS statistinėmis programomis.

2.2. Tyrimų medžiaga

Analizuojant ūminės promielocitinės leukemijos imunofenotipą tirti Vilniaus universitetinės ligoninės Santariškių klinikų pacientai, kuriems buvo nustatyta ar įtariama ūminės promielocitinės diagnozė 2008–2015 metais. Buvo rinkti šie pacientų duomenys: tyrimo data, ligos istorijos numeris, gimimo data, paciento vardas bei pavardė (šie duomenys užkoduoti specialiais kodais: AML1, AML2, AML3 ir t.t. paciento konfidencialumui užtikrinti), lytis, ėminys (kaulų čiulpai arba periferinis kraujas). Rinkti hematologinio analizatoriaus duomenys: leukocitų, trombocitų skaičius, hemoglobino įverčiai. Taip pat panaudoti tėkmės citometro analizės duomenys ir morfologinio kaulų čiulpų ar periferinio kraujo tepinėlio įvertinimo rezultatai.

Be šių duomenų taip pat buvo rinkti ir genetinių rezultatų duomenys. Genetiniais tyrimais buvo vertinama, kokios su ūmine promielocitine leukemija susijusios mutacijos yra būdingos pacientui.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

Šio tyrimo metu buvo išanalizuoti 64 ūminės promielocitinės leukemijos įtarimų atvejai. Į analizę įtraukti 44 asmenys (68,75 proc. visų tiriamųjų), kurie gydėsi Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro bendrosios hematologijos skyriuje, ir 20 Klaipėdos jūrininkų ligoninės pacientų, sudariusių 31,25 proc. tiriamųjų. 31,25 proc. tiriamųjų sudarė vyrai, kurių amžiaus mediana buvo 51-eri metai, likusius 68,75 proc. pacientų sudarė moterys, kurių amžiaus mediana 53 metai. Bendra tirtų asmenų amžiaus mediana – 52 metai. Buvo išanalizuoti 37 pacientų mėginiai, paimti iš kaulų čiulpų ir 27 pacientų periferinio kraujo mėginiai (4 lentelė).

4 lentelė. *Tirtųjų asmenų demografiniai duomenys*

Gydymo įstaiga	Klaipėdos jūrininkų ligoninė	20	Pacientų skaičius
	Vilniaus universiteto Santariškių klinikos	44	
Lytis	Vyrai	20	
	Moterys	44	
Tiriamoji medžiaga	Periferinis kraujas	27	
	Kaulų čiulpai	37	
Amžius	Vyrai	51	Mediana
	Moterys	53	
	Bendra	52	

Atlikus citomorfologinę periferinio kraujo ir kaulų čiulpu tepinėlių analizę buvo išskirtos keturios tiriamųjų asmenų grupės, pateiktos 5-toje lentelėje.

5 lentelė. Citomorfologinio tyrimo rezultatai

Ląstelių citomorfologija	Kiekis	Dalis
M+A+	22	34,38 %
M+A-	8	12,5 %
M-A+	6	9,38 %
M-A-	21	32,81 %
M3v	7	10,94 %

* M+A- būdinga promielocito morfologija, bet nerasta Auerio lazdelių; M+A+ būdinga ir promielocito morfologija, ir randamos Auerio lazdelės; M-A+ ląstelių morfologija nebūdinga ūminei promielocitinei leukemijai, randamos Auerio lazdelės; M-A- nėra promielocitinei leukemijai būdingos morfologijos, Auerio lazdelių nerasta.

Taigi iš pateiktų duomenų matyti, kad 22 pacientų blastams, sudariusiems 34,38 proc. tiriamųjų, buvo būdinga ir promielocitinių leukeminių ląstelių morfologija, ir Auerio lazdelės blasto citoplazmoje. 8 (12,5 proc.) iš 64 tirtų pacientų buvo būdinga tik ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių morfologija, tačiau promielocitų citoplazmoje nerasta Auerio lazdelių. Tuo tarpu 6 (9,38 proc.) pacientų blastų citoplazmoje Auerio lazdelės buvo rastos, tačiau blasto morfologija nebuvo būdinga ūminei promielocitinei leukemijai. 21 (32,81 proc.) pacientui nebuvo būdinga nei ląstelių morfologija, nei Auerio lazdelės citoplazmoje.

Derėtų išskirti dar vieną citomorfologinį tipą – hipogrūdėtą ūminės promielocitinės leukemijos variantą. Hipogrūdėtas ūminės promielocitinės leukemijos morfologinis variantas buvo rastas 7 tiriamiesiems (10,94 proc. visų tirtųjų ir 18,92 proc. pacientų, kuriems būdinga ūminės promielocitinės leukemijos morfologija). Šioje grupėje buvo 4 atvejai, kai blastams buvo būdinga ūminės promielocitinės leukemijos morfologija ir Auerio lazdelės mažai grūdėtoje citoplazmoje, ir 3 atvejai, kai blastas atitiko promielocito morfologiją, tačiau jo hipogrūdėtoje citoplazmoje nebuvo Auerio lazdelių.

Analizuojant bendro kraujo tyrimo rezultatus buvo nustatyta, jog vidutinė visų tirtų asmenų leukocitozė buvo $45,85 \pm 65,32 \cdot 10^9/l$, hemoglobino koncentracija vidutiniškai siekė $93,73 \pm 23,76$ mmol/l (anemija), trombocitų vidutiniškai kraujyje $64,67 \pm 103,34 \cdot 10^9/l$ (trombocitopenija). Leukocitų, trombocitų skaičiaus ir hemoglobino koncentracijos vidurkiai

atskirose morfologinėse grupėse pateikti 6-toje lentelėje. Lentelėje galima pastebėti, kad leukocitozė pasireiškia visose morfologinėse grupėse. Didžiausia leukocitozė $107,93 \pm 120,18 \cdot 10^9/l$ stebima M-A+ pacientų grupėje, taip pat neįprastai didelė leukocitozė stebima ir M3v pacientų grupėje – $75,61 \pm 94,00 \cdot 10^9/l$. Mažiausiai nukrypęs nuo normų, lyginant šio tiriamojo darbo morfologines grupes, baltojo kraujo kūnelių skaičius stebimas tose grupėse, kur blastams buvo būdinga promielocitinės ląstelės morfologija – $15,91 \pm 23,58 \cdot 10^9/l$ M+A+ grupėje ir $5,58 \pm 6,70 \cdot 10^9/l$ M+A- grupėje. Vidutiniškai daugiausiai blastų ($81,17 \pm 11,97\%$) aptikta M-A+ grupėje, kuomet M-A- grupėje nustatytas mažiausias blastų kiekis – $59,19 \pm 25,55\%$. Grupėse su promielocitui būdinga morfologija blastų kiekis nustatytas panašus: $73,77 \pm 18,71\%$ M+A+ grupėje ir $64,38 \pm 13,69\%$ M+A- grupėje.

Visiems tiriamiesiems pasireiškė ryški trombocitopenija. Mažiausias trombocitų skaičius $47,95 \pm 76,42 \cdot 10^9/l$ stebėtas tiriamųjų grupėje M+A+, taip pat M-A+ ($49,55 \pm 46,01 \cdot 10^9/l$) grupėje. Didžiausias trombocitų skaičius ($87,77 \pm 154,57 \cdot 10^9/l$) pasireiškė M-A- pacientų grupėje. Ryškių skirtumų hemoglobino koncentracijos skirtingose morfologinėse grupėse nepastebėta (6 lentelė).

6 lentelė. *Leukocitų, trombocitų, blastų skaičiaus ir hemoglobino koncentracija skirtingose morfologinėse grupėse*

Morfologinė Gr.	Leukocitai $10^9/L$	Hemoglobinas mmol/l	Trombocitai $10^9/L$	Blastai %
M+A+	$15,91 \pm 26,38$	$96,76 \pm 22,74$	$47,95 \pm 76,42$	$73,77 \pm 18,71$
M+A-	$5,58 \pm 6,70$	$82,69 \pm 23,45$	$53,85 \pm 65,86$	$64,38 \pm 13,69$
M-A+	$107,93 \pm 120,18$	$83,60 \pm 16,53$	$49,55 \pm 46,01$	$81,17 \pm 11,97$
M-A-	$64,91 \pm 54,33$	$95,98 \pm 25,41$	$87,77 \pm 154,57$	$59,19 \pm 25,13$
M3v	$75,61 \pm 94,00$	$98,79 \pm 27,34$	$73,29 \pm 43,11$	$65,43 \pm 25,55$

7 lentelė. Dominuojantys imunofenotipai morfoliginėse grupėse

Morfoliginė pacientų grupė	Imunofenotipas	Jo dažnis grupėje (%)	Dominuojanti mutacija (%)
M+A+	ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13+h/CD2- /CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-	22,7	BCR (100)
	ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/ CD13++ /CD2- /CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-	9,1	BCR (100)
	ŠŠS-h/CD34- / CD117+ / CD33+ / CD13+ / CD2+b /CD56- / CD64+b /CD15+b/HLA-DR-	9,1	BCR/FLT3
	ŠŠC-h/CD34- / CD117+ /CD33++/ CD13++ / CD2+b /CD56- /CD64+/ CD15- /HLA-DR-	18,2	BCR (66,7)
M-A+	ŠŠS-l/CD34-/CD117+b/ CD33+ / CD13++ /CD2- /CD56-/ CD64- /CD15-/HLA-DR-	33,33	NPM1+FLT3 (50)
	ŠŠC-l/CD34-/ CD117- / CD33+h / CD13+ /CD2- /CD56-/ CD64-b /CD15-/HLA-DR-	33,33	NPM1 (50)
M-A-	ŠŠS-l/CD34-/ CD117++ / CD33+ / CD13- /CD2-/CD56- /CD64-/CD15-/HLA-DR	23,81	NPM1 (60)
	ŠŠS-l/CD34-/CD117+b/ CD33+b / CD13+b /CD2- /CD56-/CD64-/CD15-/HLA-DR-	14,29	NPM1(33,33) ,FLT3 (33,33), NPM1+FLT3 (33,33)
	ŠŠS-l/CD34-/ CD117+h / CD33+ / CD13+b /CD2- / CD56+h /CD64-/CD15-/HLA-DR-	9,52	NPM1 (50)
	ŠŠS-m/CD34-/CD117+b/ CD33+b / CD13+b /CD2- / CD56+b /CD64-/CD15-/HLA-DR-	9,52	FLT3 (100)

*ŠŠS-h – aukšta šoninė šviesos sklaida, ŠŠS-m – vidutinė šoninė šviesos sklaida, ŠŠS-l – žema šoninė šviesos sklaida, CD X- – neigiama žymens raiška, CD X+b – blanki žymens raiška, CD X+h – heterogeninė žymens raiška, CD X+ – normali žymens raiška, CD X++ – ryški žymens raiška.

7-toje lentelėje pateikiami pacientų, kuriams buvo įtariama ūminė promielocitinė leukemija blastų biožymenų raiškos fenotipai skirtingose morfoliginėse grupėse. Lentelėje galia matyti, kad įtariant ūminės promielocitinės leukemijos diagnozę, blastų šoninė šviesos sklaida išsiskiria į 3 grupės: ryški šoninė šviesos sklaida (43,75% tiriamųjų), vidutinė šoninė sklaida (17,19 proc.) ir žema šoninė sklaida (39,06 proc.). Esant ūminės promielocitinės leukemijos morfologijai šoninė šviesos sklaida yra aukšta. O kai ūminės promielocitinės morfologijos nėra, šoninė šviesos sklaida yra žema ar vidutinė. CD34 žymens raiška tiek teigiamos, tiek neigiamos morfologijos atveju buvo neigiama, neigiama raiška taip pasižymėjo ir HLA-DR žymuo. Teigiamos morfologijos grupėse stebėta normali arba blanki CD117 žymens raiška, kai neigiamos morfologijos grupėje šio žymens raiška buvo skirtinga rastuose dažniausiai pasitaikančiuose variantuose: kito nuo hiperekspresijos iki blankios, pasireiškiant ir heterogeninei raiškai. Taip pat tarp morfolominių grupių skyrėsi ir CD33 žymens raiška: teigiamos morfologijos atvejais dažniausiai buvo fiksuojama CD33 žymens hiperekspresija, kuomet neigiamos morfologijos atveju šio žymens raiška buvo blanki, taip pat tarp morfolominių grupių pasiskirstė ir CD13 žymens raiška.

CD64 žymens raiška, taip pat skyrėsi morfoliginėse grupėse: tose grupėse, kur blastams nebuvo būdinga ūmaus promielocito morfologija, pasireiškė neigiama šio žymens raiška, kuomet grupėse su teigiama morfologija CD64 žymens raiška buvo intensyvi, taip pat fiksuota ir blankios CD64 žymens raiškos atvejų. CD15 žymuo morfoliginėse grupėse kito panašiai kaip CD64 žymuo: teigiamos morfologijos atveju fiksuota blanki šio žymens raiška, neigiamos morfologijos atveju šio žymens raiška buvo neigiama.

Hipogrūdėto promielocitinės leukemijos varianto ir M+A- morfologijos atvejais nebuvo rasta identiškų fenotipų, bet visiems pacientams grupėje fiksuota HLA-DR- ir CD34- žymenų neigiama raiška. CD33 žymens hiperraiška M3v grupėje pasireiškė 42, 85 proc. pacientams, likusiems buvo būdinga ryškia CD33 raiška. 85,71 proc. stebėta neigiama CD56 žymens raiška, kitu atveju fiksuota hiperekspresija. Taip pat 85,71 proc. pacientams buvo būdinga neigiama CD15 žymens raiška, kitu atveju šio žymens raiška buvo blanki. M+A- grupėje visais atvejais buvo fiksuota ryški CD33++ žymens raiška.

8 lentelė. Mutacijų dažniai morfoliginėse grupėse

Morfoliginė grupė	MUTACIJA, dažnis grupėje (atvejai/procentai)				
	BCR	NPM1	FLT3	NPM1+FLT3	Nėra mutacijos
M+A+	18 (81,82)	-	1 (4,54)	1 (4,54)	2 (9,09)
M+A-	6 (75)	-	1 (12,5)	-	1 (12,5)
M-A+	-	1 (14,29)	1 (14,29)	1 (14,29)	3 (42,86)
M-A-	3 (14,29)	9 (42,86)	2 (9,52)	5 (23,81)	2 (9,52)
M3v	4 (57,14)	1 (14,29)	1 (14,29)	1 (14,29)	-

8-toje lentelėje matyti, kad M+A+ (81,82 proc.) ir M+A- (75 proc.) grupėse asmenims daugiausia atvejų buvo nustatyta BCR geno mutacija atlikus molekulinės genetikos tyrimus. M-A+ grupėje dominavo trys mutacijų variantai: FLT3, NPM1 ir FLT3+NPM1 mutacijos, tačiau daugiausiai asmenų buvo su nepakitusiu kariotipu: 42,86 proc. tiriamųjų nebuvo nustatyta jokia genetinė mutacija. Tuo tarpu M-A- grupėje tik 2 asmenims nebuvo nustatyta genetinė mutacija, o daugumai asmenų buvo būdinga NPM1 geno mutacija (42,86 proc.). M3v morfoliginės grupės atveju, kaip ir kitose grupėse su ūminei promielocitinei leukemijai būdinga morfologija, buvo nustatyta BCR geno dominuojanti mutacija. Ši mutacija pastarojoje grupėje pasireiškė 57,14 proc. tirtųjų.

Atlikus molekulinis genetinis tyrimus buvo išskirtos 5 tiriamųjų grupės, turinčios skirtingas mutacijas. Identifikuotos tiriamųjų grupės pateikiamos 9-toje lentelėje. Matyti, kad pacientų, kuriems buvo būdinga translokacija tarp 15 ir 17 chromosomų porų, yra daugiausiai – jie sudaro 50 proc. visų tiriamųjų. Mažiausiai pacientų su FLT3 geno mutacija – 6,25 proc. Maždaug po vienodą dalį tiriamųjų sudarė asmenys, turintys NPM1 (14,06 proc.) geno mutaciją ir du mutavusius genus – NPM1 ir FLT3 (15,63 proc.). 8 pacientams, sudariusiems 12,5 proc. tiriamųjų, nebuvo identifikuota jokia molekulinė genetinė patologija.

9 lentelė. Tiriamųjų grupės pagal molekulinis genetinius duomenis

Mutacija	Pacientai	Dalis
PML-RARA, BCR tipas	32	50 %
NPM1	9	14,06 %
FLT3	4	6,25 %
NPM1+FLT3	10	15,63 %
Mutacijos nėra	8	12,5 %

10 lentelė. Kraujo rodikliai tiriamųjų grupėse su skirtingomis mutacijomis

Grupė	cMPO%/+teigiama; -neigiama	Leukocitai 10 ⁹ L	Hemoglobinas mmol/l	Trombocitai 10 ⁹ L	Blastai %
PML-RARA	95,62/+	27,79±55,6 5	90,98±25,38	51,42±69,80	70,31±19 ,54
NPM1	78,44/+	44,33±54,5 6	98,48±23,08	131,22±2,47	53,89±29 ,60
FLT3	89,25/+	76,13±58,0 7	106,08±4,56	24,83±4,56	74,75±18 ,48
NPM1+FLT3	87,30/+	105,04±93, 7	94,89±26,11	61,71±69,08	74,5±13, 53
Mutacijos nėra	91,12/+	31,13±35,6 9	90,39±20,50	68,96±51,78	58,38±26 ,2

10-toji lentelė rodo kai kurių kraujo rodiklių pasiskirstymo dėsningumus tarp skirtingų mutacijų grupių. Matyti, kad mieloperoksidazės reakcija visose grupėse rodė panašius rezultatus ir svyravo nuo 87,30 proc. iki 95,63 proc., išskyrus grupę su NPM1 mutacija, kur mieloperoksidazės reakcija buvo šiek tiek silpnesnė (78,44 proc.), tačiau pakankamai stipri,

leidžianti įtarti mieloidinio kamieno susirgimą. Ryškiausia leukocitozė stebima toje grupėje, kur tiriamiesiems buvo būdinga FLT3 ir NPM1 genų mutacija kartu.

Hemoglobino koncentracijos vertės visose tiriamųjų grupėse, išskyrus FLT3, buvo žemiau leistinos normos. Trombocitų skaičius tiriamųjų grupėse kito gana stipriai: grupėje, kur buvo būdinga NPM1 mutacija, fiksuotas didžiausias trombocitų kiekis – $131, 22 \pm 2,47 \cdot 10^9/L$, o grupėje su FLT3 mutacija rasta $24,83 \pm 4,56 \cdot 10^9/L$, kitose tiriamųjų grupėse trombocitų kiekis svyravo nuo $51, 42 \pm 69,80 \cdot 10^9/L$ tiriamųjų grupėje su PML-RARA geno mutacija iki $68,96 \pm 51,78 \cdot 10^9/L$ tiriamųjų grupėje, kur nebuvo rasta jokios molekulinės genų mutacijos. Blastų skaičius tiriamosiose grupėse taip pat variavo nuo $53,89 \pm 29,60 \%$ ir $58,38 \pm 26,2 \%$ grupėse su mutavusiu NPM1 genu ir įprasto kariotipo ligonių iki $70,31 \pm 19,54 \%$ ir $74,75 \pm 18,48 \%$ grupėse, kur buvo pacientai su PML-RARA bei FLT3 mutacijomis.

11 lentelė. *Morfologijos pasiskirstymas skirtingose geninėse tiriamųjų grupėse*

Mutacija	MORFOLOGIJA				
	Atvejai grupėje(%)				
	M+A+	M+A-	M-A+	M-A-	M3v
BCR	18 (56,25)	6 (18,75)	-	3 (9,38)	5 (15,63)
FLT3	1 (25)	1 (25)	-	2 (50)	1 (25)
NPM1				8 (88,89)	1 (11,11)
FLT3+NPM1	1 (10)	-	3 (30)	6 (60)	-
Nėra	2 (25)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25)	-

11-toji lentelė atspindi morfologijos pasiskirstymo dėsningumus skirtingų mutacijų grupėse. Matyti, kad esant BCR geno mutacijai daugiausiai atvejų – 18 iš 32 – būdinga teigiama morfologija su Auerio lazdelėmis citoplazmoje ar be jų (6 atvejai). Mutavus BCR genui taip pat būdinga ir hipogrūdėto varianto morfologija (15,63 proc. BCR mutacijos atvejų). Hipogrūdėto varianto morfologija taip pat būdinga ir FLT3 bei NPM1 genų mutacijos atveju: fiksuota po vieną šios morfologijos variantą šioms genetinių mutacijų grupėms. Tačiau FLT3 mutavusio geno atveju pusei pacientų buvo būdinga neigiama blasto be Auerio lazdelių citoplazmoje

morfologija, tokia pat morfologija (88,89 proc.) buvo būdinga ir esant NPM1 geno mutacijai bei 60 proc. šiems genams mutavus kartu. Toje grupėje, kurioje buvo pacientai su nenustatytais genetiniais pakitimais, fiksuoti 3 atvejai, kai buvo nustatyta ūminei promielocitinei leukemijai būdinga morfologija. Vienu iš jų promielocito citoplazmoje nerasta Auerio lazdelių.

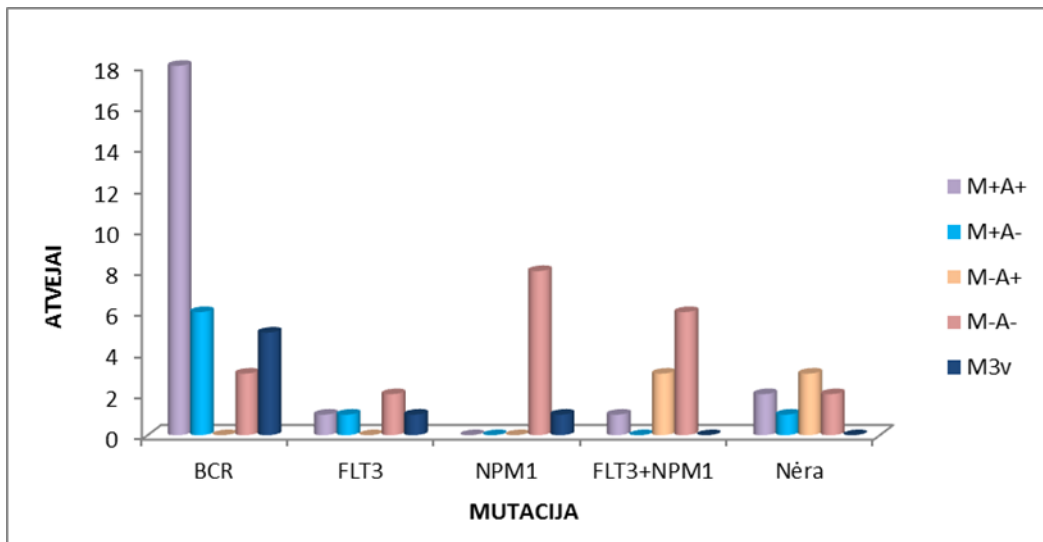
12 lentelė. Dažniausiai pasitaikantys fenotipų variantai geninėse tiriamųjų grupėse

Genetinė pacientų grupė	Imunofenotipas	Jo dažnis grupėj	Dominuojanti morfologinė grupė
BCR	ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33+/CD13+/CD2-/CD56-/CD64+b/CD15-/HLA-DR-	31,82	M+A+ (100)
	ŠŠS-h/CD34-/ CD117+b /CD33+/CD13+/CD2-/CD56-/ CD64+ / CD15+b /HLA-DR	27,27	M+A+ (100)
	ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33+/CD13+/ CD2+b /CD56-/CD64+b/CD 15-/HLA-DR-	13,64	M+A+(50) M-A- (50)
	ŠŠS-h/CD34-/ CD117+b /CD33+/ CD13+h /CD 2-/CD56-/CD64+b/CD15-/HLA-DR-	18,8	M+A+ (100)
NPM1	ŠŠS-l/CD34-/ CD117+ /CD33+/CD13-/CD2-/CD56-/CD64-/CD15-/HLA-DR-	44,44	M-A- (75)
	ŠŠS-l/CD34-/ CD117+b /CD33+/CD13-/CD2-/CD56-/ CD64+b/CD15-/HLA-DR	22,22	M-A- (100)

Stebint būdingiausias raiškos grupes pagal mutacijas (12 lentelė), matyti, kad esant BCR geno mutacijai stebima aukšta šoninės šviesos sklaida, o nesant mutacijai ar esant NPM1, FLT3 genų mutacijoms yra stebima žema šoninė sklaida. Taip pat skiriasi ir CD13 žymens raiška. PML-RARA atveju šio žymens raiška ryški, o kitų mutacijų atvejais stebimi įvairūs šio žymens raiškos variantai – nuo hiperraiškos iki neigiamos šio žymens raiškos.

Stebint pacientų grupę, kurioje yra pacientai su **FLT3 mutacija**, nerasta identiškų fenotipų tarp pacientų, tačiau visais atvejais stebėta HLA-DR ir CD34, CD2 ir CD15 žymenų neigiama raiška. Toje grupėje, kur pacientams buvo **būdinga FLT3 ir NMP1** genų mutacijos kartu, neatsiskyrė identiški fenotipai, bet taip pat buvo stebėta neigiama CD34, CD2 ir CD15 bei HLA-DR žymenų raiška ir daugeliu atvejų (pusei grupės tiriamųjų) žema šoninės šviesos sklaida. Taip pat neigiama CD34, CD2, CD56 ir CD15 žymenų raiška buvo būdinga pacientų grupei, kurių kariotipe **nebuvo identifikuota** mutacija, 62,5 proc. pacientų buvo būdinga žema šoninė sklaida. Taip pat 87,5 proc. pacientų buvo būdinga teigiama CD117 žymens raiška.

16-ame paveikslėlyje grafiškai parodomas blastų morfologijos pasiskirstymas skirtingose genetinėse grupėse. Atlikus statistinę analizę buvo apskaičiuotas Spearmano koreliacijos koeficientas tarp blastų morfologijos ir genetinės analizės. **Gauta Spearmano koreliacijos reikšmė – 0,510 esant 95 proc. pasikliautiniam intervalui.** Vadinasi yra vidutinio stiprumo ryšys tarp ląstelių morfologijos ir genetinės mutacijos. Tai galima stebėti ir iš 16-tame paveikslėlyje matomų morfologijos atvejų pasiskirstymo tarp mutavusių genų grupių: daugiausiai blastų, atitinkančių M+A+ morfologiją, fiksuojama BCR mutavusio geno atveju, tuo tarpu M+A+ morfologija, kitų mutavusių genų atveju vos keliais atvejais stebima esant FLT3+NPM1, FLT3 mutavusių genų atvejais, ir neesant jokiai mutacijai. Paveikslėlyje taip pat galima pastebėti, jog mutavus BCR genui, dauguma promielocitų atitinka M+ morfologiją, o esant kitų genų mutacijai daugiau fiksuojama M- morfologijos atvejų.



16 pav. Morfologinių grupių pasiskirstymas tarp skirtingų mutacijų

Tyrimo rezultatų tikslumui įvertinti buvo apskaičiuotas morfologinių ir fenotipinių požymių specifiškumas ir jautrumas lyginant su genetiniais žymenimis. Išnagrinėjus specifiškumą ir jautrumą skirtingose morfologinėse grupėse specifiškumo ir jautrumo rodikliai skyrėsi (13 lentelė). Didžiausias jautrumas nustatytas M+A+ morfologinėje grupėje. Citomorfologinės ir genetinės analizės jautrumas šioje grupėje siekė 58,1 proc, specifiškumas 87,9 proc., kai bendras jautrumas visų morfologiškai teigiamų atvejų (M+A+, M+A-, M3v grupės kartu) siekė 90,3 proc., o specifiškumas buvo mažesnis – 72,7 proc. Mažiausias jautrumas nustatytas M- grupėse. M-A+ grupėje jautrumas siekė 9,7 proc., o M-A+ grupėje jautrumas nefiksuotas, nesant atvejų, kuomet ląstelių morfologija atitinka M-A+ atvejį, o genetinės analizės duomenys parodo translokaciją tarp 15 ir 17 chromosomų porų. Tačiau specifiškumas M-A+ grupėje stebėtas pakankamai didelis – 81,8 proc. Mažas jautrumas nustatytas ir M3v grupėje. Čia jautrumas siekė tik 12,9 proc., kuomet specifiškumas šioje grupėje buvo pakankamai aukštas – 90,9 proc. Panašus specifiškumas (93,9 proc.) identifikuotas M+A- grupėje, tačiau jautrumas šioje grupėje siekė vos 19,4 proc. Morfologiškai neigiamos grupės, skirtingai nei jautrumo atveju, gautais specifiškumo rezultatais skyrėsi: M-A+ grupėje specifiškumas buvo 1,8 karto didesnis nei M-A- grupėje.

13 lentelē. Jautrumas ir specifiskumas skirtingose grupėse

		Jautrumas, %	Specifiskumas, %
Morfologinė grupė	M+A+	58,1	87,9
	M+A-	19,4	93,9
	M-A+	0	81,8
	M-A-	9,7	45,5
	M3v	12,9	90,9
	M+grupės	90,3	72,7

14 lentelē. Skirtingų fenotipų jautrumas ir specifiskumas morfologinėse grupėse

		Atvejai grupėje				
		BCR	NPM1	FLT3	NPM1+FLT3	Nėra mutacijos
M+A+	A fenotipas	4	-	-	-	1
	B fenotipas	4	-	-	-	1
	C fenotipas	4	-	-	-	4
	D fenotipas	4	-	-	-	1
M-A+	E fenotipas	-	3	-	1	1
	F fenotipas	1	3	-	1	2
M-A-	G fenotipas	-	3	-	1	1
	H fenotipas	1	3	-	1	2
	I fenotipas	1	1	1	1	-
	J fenotipas	-	-	-	3	-

***čia**

A fenotipas: ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13+h/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-

B fenotipas: ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13++/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-

C fenotipas: ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33+/CD13+/CD2+b/CD56-/CD64+b/CD15+b/HLA-DR-

D fenotipas: ŠŠC-h/CD34-/CD117+/CD33++/CD13++/CD2+b/CD56-/CD64+/CD15-/HLA-DR-

E fenotipas: ŠŠS-l/CD 34-/CD 117+b/CD 33+/CD 13++/CD 2-/CD 56-/CD 64-/CD 15-/HLA-DR-

F fenotipas: ŠŠC-l/CD 34-/CD 117-/CD 33+h/CD 13+/CD 2-/CD 56-/CD 64-b/CD 15-/HLA-DR-

G fenotipas: ŠŠS-l/CD 34-/CD 117++/CD 33+/CD 13-/CD 2-/CD 56-/CD 64-/CD 15-/HLA-DR

H fenotipas: ŠŠS-l/CD 34-/CD 117+b/CD 33+b/CD 13+b/CD 2-/CD 56-/CD 64-/CD 15-/HLA-DR-

I fenotipas: ŠŠS-l/CD 34-/CD 117+h/CD 33+/CD 13+b/CD 2-/CD 56+h/CD 64-/CD 15-/HLA-DR-

J fenotipas: ŠŠS-m/CD 34-/CD 117+b/CD 33+b/CD 13+b/CD 2-/CD 56+b/CD 64-/CD 15-/HLA-DR-

Pateiktoje 14-toje lentelėje matoma, kaip pasiskirsto fenotipų dažnis, esant skirtingai morfologijai ir mutacijoms. Matoma, jog esant M+ morfologijai, daugiausiai fiksuota C fenotipo atvejų (8), o A, B ir D fenotipų atvejų po lygiai (5). M-A+ atveju, dažniau buvo sutinkamas F fenotipas (7 atvejais), M-A- atvejais, daugiausiai fiksuota H fenotipo atvejų (7). Atsižvelgiant į pačius fenotipus, iš šios lentelės taip pat galima pastebėti dėsningumą, jog esant NPM1 mutacijai būdingai kinta CD13 ir CD33 žymenų raiška: jei M+ atvejais, nesant šios mutacijos CD33 žymens raiška yra ryški, tai NPM1 mutavusio geno atveju CD33 žymuo ekspresuojamas silpniau: pasireiškia normali ar heterogeninė, o H fenotipo atveju ir blanki šio žymens raiška. Panašūs kitimai stebimi ir CD13 žymens raiškoje: ryškią ar normalią CD13 žymens raišką M+ grupėje keičia, blanki, o G fenotipo atveju ir neigiama raiška. Taip pat, matoma, jog kinta ir CD56 žymens ekspresija, esant FLT3 mutacijai. I fenotipo atveju, iki tol visuose fenotipuose stebėtą neigiamą CD56 raišką keičia heterogeninė CD56 žymens raiška.

15-toje lentelėje matyti, kaip skyrėsi skirtingų fenotipų jautrumo ir specifiškumo reikšmės: visų fenotipų jautrumas yra nedidelis, tuo tarpu specifiškumo įverčiai gana aukšti. M+A+ grupėje, visų fenotipų atvejais (vertinant kiekvieno fenotipo jautrumą atskirai) jautrumas buvo lygus 21,1 proc., tuo tarpu bendras M+A+ fenotipų jautrumas buvo lygus 84,2%. Iš pateiktų duomenų matome, kad nors ir jautrumas visais fenotipų atvejais buvo vienodas, specifiškumo reikmės skyrėsi: specifiškiausi M+A+ grupėje buvo A, B ir D fenotipai (97,1 proc.), tačiau C fenotipo specifiškumas buvo gana artimas – 88,6 proc. Kitaip nei jautrumo atžvilgiu bendras visos M+ grupės specifiškumas buvo žemesnis nei atskirų atvejų ir siekė 80,0 proc.

M- grupėse fenotipų jautrumas taip pat buvo nedidelis: F, H, I fenotipų atvejais jis siekė vos 5,3 proc, o E, G, J fenotipų atvejais jautrumas nenustatytas dėl nenustatytų atvejų, kuomet pacientams, kurių blastai ekspresavo šį fenotipą, būtų identifikuota BCR mutacija. Tuo tarpu šių fenotipų specifiškumai buvo aukšti: E ir G – 85,7 proc., o J fenotipo specifiškumas siekė net 91,4 proc.

15 lentelė. *Skirtingų fenotipų jautrumas ir specifiškumas morfologinėse grupėse*

		Jautrumas, %	Specifiškumas, %
M+A+	A fenotipas	21,1	97,1
	B fenotipas	21,1	97,1
	C fenotipas	21,1	88,6
	D fenotipas	21,1	97,1
	M+ atvejų fenotipai kartu	84,2	80,0
M-A+	E fenotipas	0,0	85,7
	F fenotipas	5,3	82,9
M-A-	G fenotipas	0,0	85,7
	H fenotipas	5,3	85,3
	I fenotipas	5,3	91,4
	J fenotipas	0,0	91,4

NPM1 geno mutacijos atveju nustatytas 0,82 Spearmano koreliacijos stiprumo ryšys (16 lentelė) tarp NPM1 geno mutacijos ir M-A- ląstelių morfologijos. FLT3 geno mutacijos atveju ryšys tarp ląstelių morfologijos ir genų mutacijos buvo silpnėsnis – $r=0,33$, esant 95 proc. pasikliautiniam intervalui. FLT3 geno mutacijos atveju išsiskyrė trys morfologinės grupės, kurių ryšys su FLT3 mutacija nebuvo stiprus – nustatyti M3v, M+A- ir M+A+ atvejai, tolygiai pasiskirstę grupėje. FLT3+NPM1 mutacijos atveju bendras ryšio stiprumas nustatytas 0,54, kuomet ryšys tarp FLT3+NPM1 mutacijų ir M-A- fenotipo buvo lygus 0,62. Nesant mutacijų, pacientų, kuriems įtariama ūminė promielocitinė leukemija, kariotipe ryšys tarp mutacijos nebuvimo ir morfologijos taip pat buvo labai žemas – 0,29. Nesant mutacijų morfologija buvo įvairi – nuo M+A+ atvejų iki M- atvejų, nefiksuota tik M+A- ir M3v atvejų. Kiti atvejai pasiskirstė grupėje tolygiai, dominuojančio morfologinio atvejo nenustatyta. Vertinant fenotipų ir

mutacijų ryšio stiprumus, fenotipų ir mutacijų ryšio stiprumai neįvertinti FLT3, NPM1+FLT3 mutacijų ir mutacijos nebuvimo atvejais dėl nerastų identiškų fenotipų. NPM1 mutacijos atveju F fenotipo ir NPM1 mutacijos ryšys buvo lygus 0,56.

16 lentelė. *Ne PML būdingų mutacijų i morfolginių grupių ryšių stiprumo įvertinimas*

Mutacija	Ryšio stiprumas tarp mutacijos ir morfologijos (<i>Spermano koreliacijos koeficientas</i>)
NPM1	0,82 esant M-A- morfologijai, 0,56 esant F fenotipui
FLT3	0,33
FLT3+NPM1	0,54 esant M-A- morfologijai: 0.62
Nėra mutacijos	0,29

4. TYRIMŲ REZULTATŲ APTARIMAS

Atlikto tyrimo metu ūminės promielocitinės leukemijos diagnozė buvo įtarta 64 pacientams. Didžiąją dalį pacientų sudarė moterys (68,75 proc.). Didesnis moterų sergamumas ūmine promielocitine leukemija yra pastebimas ir kituose darbuose, pavyzdžiui, 2012 metais Duffield atlikto tyrimo metu ūminė promielocitinė leukemija buvo nustatyta 32 moterims ir 24 vyrams. Šio tyrimo metu daugumą tirtų promielocitinės leukemijos atvejų sudarė M3 varianto leukemijos, M3v nustatyti tik 7 atvejai iš 37 atvejų su ūminei promielocitinei leukemijai būdinga morfologija. Kitų mokslininkų tyrimų duomenimis, M3v variantai taip pat klinikinėje praktikoje pasitaiko nuo 10 iki 25 proc. promielocitinės leukemijos atvejų [60]. Teigiama, kad M3v yra būdingesnė leukemijos forma tarp sergančiųjų vaikų. Pacientai, kurių amžius >40 metų, dažniau serga M3 leukemija [77]. Atlikto tyrimo metu buvo analizuojami pacientų duomenys, kurių amžiaus mediana buvo 52 metai, taigi didesnei daliai pacientų buvo būdinga įprasta ūminės promielocitinės leukemijos morfologija. M3 ir M3v ūminės promielocitinės leukemijos tipai tarpusavyje skiriasi nedaug, tačiau būtina tiksliai identifikuoti skirtumus tarp jų, kadangi juos atskyrus galimas kitoks gydymas, nulemsiantis geresnę ligos eigos prognozę. Pirmiausia, kaip ir buvo minėta, šie tipai skiriasi savo morfologija: M3 atvejais identifikuoti promielocitai buvo itin grūdėta citoplazma, daugelyje jų identifikuotos Auerio lazdelės, tuo tarpu M3v atveju promielocitų citoplazmos buvo labai minimaliai grūdėtos ar McGrūdėtos, Auerio lazdelių rasta labai mažai, pavienės arba jų identifikuota nebuvo. M3 žymenų raiška nuo M3v skyrėsi nedaug – abiem grupėm buvo būdinga neigiama HLA-DR raiška. CD34 žymens raiška šiek tiek skyrėsi – M3v atveju ji buvo blanki, M3 varianto atveju, užfiksuota daugiau neigiamos raiškos atvejų nei blankios, taip pat M3 varianto atveju CD13, CD33, CD56, CD 117 ir CD 15 žymenų raiška buvo įvairesnė nei M3v grupėje. Taigi pastebima tendencija, jog M3v būdingesnės siauresnės žymenų raiškos svyravimo ribos. Tokius pat M3 ir M3v atvejų žymenų raiškos ypatumus 2010 metais publikavo ir Tallman bei kiti. Jų atliktų tyrimu metu pacientų, kuriems būdingas hipogrūdėtasis ūminės promielocitinės leukemijos variantas, blastų paviršiaus žymenų raiška pasižymėjo mažesnėmis variacijomis nei įprastos ūminės promielocitinės leukemijos atveju.

Buvo nustatyti 2 atvejai, kai morfologija atitiko ūminės promielocitinės leukemijos morfologiją, tačiau nebuvo nustatyta PML-RARA mutacija, o identifikuota FLT3 geno mutacija. FLT3 geno mutacijos yra būdingos daugeliui mielodinių leukemijos formų, tarp jų gali pasitaikyti ir ūminės promielocitinės leukemijos atvejų, ypač esant hipogrūdėtam ūminės promielocitinės leukemijos atvejui. Vienas iš dviejų FLT3 geno mutacijos atvejų šio tyrimo metu

atitiko hipogrudėto ūminės promielocitinės leukemijos atvejį. Kitų tyrimų duomenimis, FLT3 geno mutacija esant ūminei promielocitinei leukemijai taip pat sutinkama retais atvejais: 2008 metais atlikto tyrimo metu iš 2762 atvejų, kai ligoniams buvo nustatyta FLT3 geno mutacija tik 4,7 proc. mutavusių genų sukėlė M3 tipo leukemiją ir 11,8 proc. M3v leukemijos formą. Visi šio tyrimo rezultatai yra aprašyti Backer ir kitų darbe. Kartu su FLT3 mutacija dažnai galima nustatyti ir NPM1 geno mutaciją, kas taip pat yra būdinga mieloidinėms leukemijų formoms, ypač tokios mutacijų kombinacijos būdingos vyresnio amžiaus žmonėms, sergantiems ūmine mieloidinės leukemijos forma [56]. 10 tokių atvejų buvo identifikuoti šio darbo metu, tačiau tik 1 jų atitiko ūminei promielocitinei leukemijai būdingą morfologiją. Kol kas duomenų apie NPM1 geno mutacijos įtaką ūminės promielocitinės leukemijos formavimuisi nėra daug, todėl galima daryti prielaidą, kad atvejis, atitinkantis ūminę promielocitinę leukemiją, buvo nulemtas FLT3, o ne NPM1 geno mutacijos.

Analizuojant ne tik konkrečius blastų paviršiaus žymenis, o ir blastų bendras savybes, tokias kaip šoninė šviesos sklaida (ŠŠS), tyrimo metu įtariant ūminę promielocitinę leukemiją išskirtos 3 grupės: ryški šoninė šviesos sklaida (43,75% tiriamųjų), vidutinė šoninė sklaida (17,19 proc.) ir žema šoninė sklaida (39,06 proc.). Tokie šoninės sklaidos kitimai gali būti kaip vienas iš ūminei promielocitinės leukemijos atveju būdingų požymių. 2011 metais H. Y. Dong ir komandos atlikto tyrimo metu ŠŠS reikšmės taip pat išsiskyrė plačiose ribose: ūminės promielocitinės leukemijos blastai vienu atveju apėmė ir tipinių, kraujyje dominuojančių granulocitų regioną (ryški šoninė sklaida) ir taip pat promielocitų žema šoninė sklaida buvo būdinga įprastų mieloblastų regionui. Taigi galima daryti prielaidą, kad ūminei promielocitinei leukemijai yra būdingos plačios blastų šoninės sklaidos vertės. Tačiau daugeliu atvejų šoninė šviesos sklaida yra aukšta – tai vienas iš ūminės promielocitinės leukemijos fenotipo požymių, leidžiantis ūminę promielocitinę leukemiją atkirti nuo kitų ūminių leukemijų. Atlikto tyrimo metu dažniausiai pasitaikančiuose ūminės promielocitinės leukemijos imunofenotipių atvejuose buvo stebima aukšta šoninės šviesos sklaida, o nesant ūminės promielocitinės leukemijos morfologijai fiksuota priešingai – žema šoninė šviesos sklaida.

Toliau analizuojant blastų raiškos ypatumus gautus tyrimų rezultatus galima palyginti su H. Y. Dong ir kitų mokslininkų atlikta HLA-DR, CD34 ir CD117 žymenų raiškos analize, kuri rodė tokius pačius rezultatus, kokie ir buvo gauti atliekant šį tyrimą. H. Y. Dong, gavęs rezultatus, teigė, kad ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėms yra būdinga ryškiai ekspresuoti CD117 (94,6 proc.) žymenį ir neekspresuoti HLA-DR (96 proc.) bei CD34 (76,5 proc.) žymenų. Žema ar neigiama CD56 žymens ekspresija taip pat yra vienas iš požymių, būdingų ūminei promielocitinei leukemijai. Panašūs rezultatai buvo gauti ir šio tyrimo metu:

HLA – DR raiška nebuvo identifikuota nė vienam pacientui, CD34 ekspresavo tik 19% pacientų, vadinasi neigiama CD34 raiška buvo būdinga 81% tirtųjų. Teigiamą raišką CD117 šio žymens buvo būdinga 94 proc. pacientų.

Stebint kitų biožymenų raiškos ypatumus, pastebėta, kad atlikto tyrimo metu CD64 žymens raiškos intensyvumas buvo skirtingas pasirinktose tiriamųjų grupėse. Daugiausiai blastų, ekspresavusių CD64 žymenį, buvo toje tiriamųjų grupėje, kurioje pacientai turėjo promielocitinei leukemijai būdingą morfologiją. Tuo tarpu toje grupėje, kurios tiriamiesiems nebūdinga promielocitinės leukemijos morfologija, CD64 žymens raiška buvo neigiama. Neigiama CD64 žymens raiška stebima ir ūminės promielocitinės leukemijos hipogrūdėto varianto atveju bei esant FLT3, NPM1 ar kartu mutavusiems FLT3 ir NPM1 genams. Turintiems BCR geno mutaciją pasireiškė blanki bei normali CD64 žymens ekspresija. Blanki ar neigiama CD64 raiška taip pat stebėta ir toje tiriamųjų grupėje, kurioje buvo asmenys, neturintys jokių genetinių pakitimų. Taigi promielocitams yra būdinga ekspresuoti CD64 žymenį, jei promielocitų kilmė yra nulemta BCR geno mutacijos. Literatūros duomenys patvirtina, kad promielocitai ekspresuoja CD64 žymenį, tačiau minima, jog jo raiška gali būti ir normali, ir blanki [17;24;21]. 2014 metais paskelbtoje publikacijoje teigiama, kad CD64 žymens raiška ūminės promielocitinės leukemijos atveju gali būti labai įvairi. 2014 metais Kinijoje Xu ir kitų tyrėjų atlikto tyrimo metu CD64 žymens raiška kito grupėse nuo 0-10 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % ir 80-100 %. Mūsų tyrimo metu normali ir blanki raiška buvo nustatyta tiriamųjų grupėje, kurių pacientams būdinga ūminės promielocito leukemijos morfologija.

Esant ūminės promielocitinės leukemijos morfologijai ir BCR ar NPM1 genų mutacijai, atlikto tyrimo metu stebėtos ryškios CD13 žymens raiškos. Kita vertus, mutavus FLT3 genui, ar nesant mutacijos, stebima blanki ar netgi neigiama žymens raiška ant blastų. Ryški CD13 žymens raiška, esant ūminei promielocitinei leukemijai BCR mutavusio geno atveju 2013 metais aprašyta ir publikuota Polish Journal of Pathology žurnale tyrėjo Gorczyza Wojciech. Gauti tyrimų rezultatai rodė, jog ryški CD13 žymens raiška būdinga 93 proc. pacientų. Publikacijoje, kaip ir mūsų atlikto tyrimo metu stebima ryški CD117 (100 proc. dažnumas), CD33 (100 proc.) žymenų raiška bei neigiama CD2 (19 proc. blastų ekspresavusių žymenį), CD56 (16 proc. blastų ekspresavusių žymenį) ir CD34 (9 proc. blastų ekspresavusių žymenį) žymenų raiška.

Pasitaiko atvejų, ypač esant kurio nors žymens aberantinei ekspresijai, kuomet sunku tiksliai nustatyti paciento diagnozę vien iš tėkmės citometrijos tyrimo rezultatų. Todėl yra būtina atlikti citomorfologinį tyrimą, identifikuojant blastų morfologiją, taip pat atlikti ir genetinę analizę ūminės promielocitinės leukemijos diagnozei patvirtinti ar atmesti. Atlikto tyrimo metu CD117 žymuo pasižymėjo aberantine raiška, nors ūminės promielocitinės leukemijos atveju yra

būdinga CD117 ryški raiška, pasitaikė atveju, kuomet CD117 žymens ekspresija buvo neigiama. Dažniausiai neigiama CD117 žymens raiška yra būdinga granulocitams, taigi tokios piktybinės ląstelės galėjo būti palaikytos granulocitais ir iškreipti tikrąsias CD117 žymens vertes. Aberantinė CD117 žymens raiška ūminės promielocitinės leukemijos atveju yra fiksuojama ir aprašoma ir kitų tyrėjų. Pavyzdžiui, „American Journal of Clinical Pathology“ 2011 metais Dong ir kitų publikuotama straipsnyje teigiama, kad promielocitai, imituodami granulocitus ar mieloblastus, gali turėti tokį fenotipą: CD34+, HLA-DR+, CD117-, taip pat aukštą ŠŠS sklaidą, kas būdinga neutrofilams.

Tyrimo metu nustatytas didelis blastų morfologijos specifiskumas lyginant su genetiniu ūminės promielocitinės ligos patvirtinimu įrodo, kad įtarus ūminę promielocitinę leukemiją pagal klinikinius simptomus bei nustčius ar įtarus ūminės promielocitinės leukemijos imunofenotipą tekmės citometrijos metodu reikalinga atlikti citomorfologinį tepinėlio tyrimą. Tai leidžia gydytojui greičiau skirti reikiamą gydymą pacientui, kol ligos diagnozė dar nėra patvirtinta genetiškai. Šio tyrimo metu kaip specifiskiausi fenotipai buvo nustatyti A, B ir D grupėms priklausantys fenotipai. Šie fenotipai priklausė M⁺ morfologiją atitinkančių blastų grupei. Skirtingai nuo kito dominavusio fenotipo M⁺ tiriamųjų grupėje šiems fenotipams buvo būdinga intensyvi CD33 žymens raiška ir normali CD64 žymens raiška. Kuomet, tie fenotipai, kurie buvo mažiau specifiski pasižymėjo normalia CD33 žymens raiška, o CD64 žymens raiška identifikuota blanki. Tyrimo metu, gauti maži jautrumai tarp tiriamųjų su skirtingomis mutacijomis ir promielocito morfologijos taip pat patvirtina citomorfologinio tyrimo svarbą. Mažos jautrumo reikšmės yra paaiškinamos tuo, kad ūminei promielocitinei leukemijai būdingos morfologijos nerasta, bet diagnozuota mieloidinės kilmės leukemija, kurią gali nulemti FLT3 ar NPM1 genai [58]. Šie genai nėra specifiski būtent šiai leukemijos formai ir pasitaiko tarp pacientų, sergančių kitomis ūminėmis mieloidinėmis leukemijomis.

Iš gautų tyrimų rezultatų matyti, kad ūminė promielocitinė leukemija neturi aiškaus monotoniško imunofenotipo, kuris aiškiai skirtųsi nuo kitų mieloidinių leukemijų formų. Be to, žymenys gali pasižymėti aberantine ekspresija, tad esant klinikiniams simptomams, CD34-, HLA-DR+, CD56- ir CD64+ žymenų raiškai, greitesnei remisijai užtikrinti būtina atlikti citomorfologinį tepinėlio tyrimą. Tai, jog nėra aiškaus monotoniško imunofenotipo, padedančio tiksliai nustatyti ūminės promielocitinės leukemijos diagnozę, savo darbe mini ir Ambayya (2014) su kitais mokslininkais. Remdamiesi savo atlikto tyrimo įžvalgomis jie teigia, kad „auksinis standartas“ ūminei promielocitinei leukemijai nustatyti – genetinis tyrimas ir translokacijos tarp 15 ir 17 chromosų porų patvirtinimas. Tačiau jie taip pat pabrėžia, kad svarbu įvertinti blastų biožymenų raišką ir jų morfologiją.

Tyrimo duomenis lyginant su literatūros duomenimis [66], vertinant ūminės promielocitinės leukemijos skirtumus nuo kitų ūminių mieloidinės kilmės leukemijų, matyti, jog ūminės promielocitinės leukemijos išsikirtinis bruožas lyginant su kitomis mielogeninėmis leukemijomis – neigiama HLA-DR žymens raiška. Atlikto tyrimo metu, visiems pacientams, kuriems įtariama ūminė promielocitinė leukemija, užfiksuota neigiama HLA-DR žymens raiška. Kitas ūminės promielocitinės leukemijos išskirtinumas – neigiama CD34 žymens raiška. M3 leukemijai būdinga ryški CD33 žymens raiška, tačiau kitoms ūminėms mieloidinės kilmės leukemijoms taip pat būdinga ryški šio žymens raiška pavyzdžiui, CD33 ryški žymens raiška pasireiškia ir esant ūminei mieloidinės kilmės leukemijai su mutavusiu CEBPA genu. Tačiau ši leukemija nuo ūminės promielocitinės leukemijos skiriasi tuo, kad ūminei promielocitinei leukemijai būdinga neigiama CD13 ir CD15 žymenų raiška, kokia ir buvo nustatyta šio tyrimo metu, o ūminei mieloidinei leukemijai su mutavusiu CEBPA genu būdinga ryški šių žymenų raiška. Be blastų žymenų raiškos skirtumų, matoma, jog nesant ūminės promielocitinės leukemijos diagnozės blastų šoninė sklaida yra žema ar vidutinė. Iš tyrimo duomenų matyti, kad visuose fenotipuose, kur nebuvo identifikuota blastų morfologija ar translokacija tarp 15 ir 17 chromosomų porų, stebima žema ar vidutinė šoninė šviesos sklaida.

IŠVADOS

1. Įtariant ūminę promielocitinę leukemiją dažniausiai sutinkama ši biožymenų kombinacija: neigiama HLA-DR, CD34 biožymenų raiška, žema CD56 žymens raiška, teigiama CD117 žymens raiška ir aukšta CD64 žymens ekspresija bei aukšta blastų šoninės šviesos sklaida, esant mutacijai tarp 15 ir 17 chromosomų porų. Neradus translokacijos tarp 15 ir 17 chromosomų porų, blastams būdinga neigiama CD64 ir CD15 žymenų raiška, blanki CD13 žymens raiška ir žema šoninė šviesos sklaida.
2. Tarp pacientų, kuriems nustatyta ūminė promielocitinė leukemija, vieno monotoniško fenotipo, būdingo ūminei promielocitinei leukemijai nėra. Nustatyti šie būdingiausi blastų biožymenų raiškos imunofenotipai:
 - ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13+h/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-
 - ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13++/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-
 - ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33+/CD13+/CD2+b/CD56-/CD64+b/CD15+b/HLA-DR-
 - ŠŠC-h/CD34-/CD117+/CD33++/CD13++/CD2+b/CD56-/CD64+/CD15-/HLA-DR-.
3. Ūminei promielocitinei leukemijai specifiškiausia (80.0%) ir jautriausia (84.2%) yra būdingų blastų imunofenotipų ir teigiamos promielocitų morfologijos kombinacija.

SANTRAUKA

Šio tyrimo tikslas – nustatyti ūminei promielocitinei leukemijai būdingiausius blastų biožymenų raiškos ypatumus. Šiam tikslui įgyvendinti išsikelti tokie uždaviniai: rasti blastų biožymenų raiškos dėsningumus pacientams, kuriems įtariama ūminė promielocitinė leukemija; nustatyti blastų imunofenotipų spektrą esant ūminei promielocitinei leukemijai; identifikuoti ūminei promielocitinei leukemijai jautriausius ir specifiskiausius laboratorinių tyrimų parametrus.

Iškeltam tikslui ir uždaviniams įgyvendinti ištirti 64 asmenys, kuriems buvo įtariama ūminė promielocitinė leukemija. Visi asmenys gydyti Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Hematologijos skyriuje 2008–2015 metais. Tyrimo metu buvo analizuojami šie pacientų duomenys: lytis, amžius ir leukogramos rodikliai. Tyrimui atlikti itin buvo svarbūs šie pacientų duomenys: blastų biožymenų raiška, nustatyta tėkmės citometru; citomorfologinė pacientų kaulų čiulpų ar periferinio kraujo analizė bei molekulinės genetikos duomenys apie esamas ar nesamas paciento mutacijas, galėjusias sukelti ūminę promielocitinę leukemiją.

Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad ūminei promielocitinei leukemijai yra būdingiausia tokia biožymenų kombinacija: neigiama HLA-DR, CD34 biožymenų raiška, žema CD56 žymens raiška, teigiama CD117 žymens raiška ir aukšta CD64 žymens raiška ir aukšta šoninė šviesos sklaida, esant mutacijai tarp 15 ir 17 chromosomų porų.; nustatyti 4 ūminei promielocitinei leukemijai būdingiausi imunofenotipai:

ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13+h/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-;

ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13++/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-;

ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33+/CD13+/CD2+b/CD56-/CD64+b/CD15+b/HLA-DR-;

ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33++/CD13++/CD2+b/CD56-/CD64+/CD15-/HLA-DR-

.Jautriausi fenotipai iš jų buvo:

ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13+h/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR-;

ŠŠS-h/CD34-/CD117+b/CD33++/CD13++/CD2-/CD56-/CD64+/CD15+b/HLA-DR- ir

ŠŠS-h/CD34-/CD117+/CD33++/CD13++/CD2+b/CD56-/CD64+/CD15-/HLA-DR-.

Raktiniai žodžiai: ūminė promielocitinė leukemija, tėkmės citometrija, imunofenotipas, blastų biožymenų raiška, HLA-DR-, CD34-.

SUMMARY

The objective of the study – is to determine the most characteristic of acute promyelocytic leukemia blasts biomarker expression features. To achieve this objective there has been assigned the following tasks: Applying Flow cytometry method to find out the most typical promyelocytic leukemia immunophenotype markers; identify the most typical blast immunophenotype of acute promyelocytic leukemia; identify the most sensitive and most specific immunophenotype for acute promyelocytic leukemia

To fulfill the Objective and Tasks we examined 64 patients who were suspected of acute promyelocytic leukemia. All of these individuals have been treated in Santariškės Vilnius University Hospital Department of Hematology in years 2008-2015. This study analyzed patient`s data such as gender, age, complete blood count. Extremely important for the study was patient`s data: blast biomarkers expression - assessed by a flow cytometer, cytomorphological patient`s bone marrow or peripheral blood analysis and molecular genetics data on presence or absence of mutations, which have resulted in acute promyelocytic leukemia.

The obtained results showed that for acute promyelocytic leukemia the most typical biomarkers combinations are: a negative HLA-DR, CD34 biomarkers expression, low CD56 marker expression, positive CD117 marker expression and high CD64 sign expression at mutations between 15 and 17 chromosomes couples; research has revealed 4 typical acute promyelocytic leukemia immunofenotypes: SSC-h / CD34- / CD117 + b / CD33 ++ / CD13 + h / CD2- / CD56- / CD64 + / CD15 + b / HLA-DR-; SSC-h / CD34- / CD117 + b / CD33 ++ / CD13 ++ / CD2- / CD56- / CD64 + / CD15 + b / HLA-DR-; SSC-h / CD34- / CD117 + / CD33 + / CD13 + / CD2 + b / CD56- / CD64 + b / CD15 + b / HLA-DR-; SSC-H / CD34- / CD117 + / CD33 ++ / CD13 ++ / CD2 + b / CD56- / CD64 + / CD15- / HLA-DR-; the most sensitive phenotypes of them were SSC-h / CD34- / CD117 + b / CD33 ++ / CD13 + h / CD2- / CD56- / CD64 + / CD15 + b / HLA-DR-; SSC-h / CD34- / CD117+ b / CD33 ++ / CD13 ++ / CD2- / CD56- / CD64 + / CD15 + b / HLA-DR- and SSC-H / CD34- / CD117 + / CD33 ++ / CD13 ++ / CD2 + b / CD56 - / CD64 + / CD15- / HLA-DR-.

Keywords: acute promyelocytic leukemia, flow cytometry, immunophenotype, blasts biomarkers expression, HLA-DR-, CD34-.

LITERATŪRA

1. Ades L., Guerci A. Raffoux E., Sanz M., Chevallier P., Lapusan S., Recher C., Thomas X., Rayon C., Castaigne S., Tournilhac O., Botton S., Ifrah N., Cahn J.Y., Solary E., Gardin C., Fegeux N., Bordessoule D., Ferrant A., Monard S.M., Vey N., Dombret H., Degos L., Chevret S., Fenaux P., and for the European APL Group. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood Journal* 2010; 115 (9).
2. Affymetrix, prieiga per internetą <http://www.ebioscience.com/resources/human-cd-chart.htm>, žiūrėta [2016 01 30]
3. Ambayya A., Zainina S., Salmiah M.S., Sabariah M.N. Antigen Expression Patern of Acute Promielocytic Leukaemia Cases in Malaysia. *Med Malaysia* 2014; Vol. 69 (2).
4. American Cancer Society, prieiga per internetą <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutemyeloidaml/detailedguide/leukemia-acute-myeloid-myelogenous-classified> žiūrėta [2016 01 28]
5. Antman K.H. Introduction: The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy. *The Oncologist* 2010; Vol. 6(2) p. 1–2.
6. Bacher U., Haferlach C., Kern W., Haferlach T., Schnittiger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *BLOOD* 2008; Vol. 111, No 5.
7. Bain B.J. *A Blood Cells A Practical Guide*. 2006
8. Barragán E., Montesinos P., Camos M., González M., Calasanz M.J., Román-Gómez J.R., Gómez-Casares M.T., Ayala R., López J., Fuster O., Colomer D., Chillón C., Larrayoz M.J., Sánchez-Godoy P., González-Campos J., Manso F., Amador M.L., Vellenga E., Lowenberg B., Sanz M.A. Prognostic Value Of FLT3 Mutations In Patients With Acute Promyelocytic Leukemia Treated With All-Trans Retinoic Acid And Anthracycline Monochemotherapy. *Heamatologica* 2011; Vol. 96 p. 1470–1477.
9. Bittencourt H., Teixeira A.L., Gloria A.B.F., Ribeiro A.F.L.T., Fagundes E.M. Acute promyelocytic leukemia presenting as an extradural mass. 2011
10. Breccia M., Loglisci G., Loglisci M.G., Ricci R., Latgliata R., Foa R., Lo-Coco F. FLT3-ITD confers poor prognosis in patients with acute promyelocytic leukemia

- treated with AIDA protocols: long-term follow-up analysis. *Haematologica* 2013; Vol.98(12).
11. Breen K.A., Grimwade D., Hunt B.J. The pathogenesis and management of the coagulopathy of acute promyelocytic leukaemia. *British Journal of Hematology* 2011; Vol. 156, Issue 1., p. 24-36.
 12. Brown M., Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology, *Clinical Chemistry* 2011; 46(8) p. 1221-1229.
 13. CancerCompass. Prieiga per internetą <https://www.cancercompass.com/leukemia-information/types-of-leukemia.htm>. [Žiūrėta 2016 01 31]
 14. Cervera J., Montesinos P., Hernandez-Rivas J.M., Calesanz M.J., Aventin A., Ferro M.T., Luno E., Sanchez J., Vellenga E., Rayon C., Milone G. Serna J., Rivas C., Gonzalez J.D., Tormo M., Amutio E., Gonzalez E., Brunet S., Lowenberg B., Sanz M.A. Additional Chromosome Abnormalities In Patients With Acute Promyelocytic Leukemia Treated With All-*Trans* Retinoic Acid and Chemotherapy. *Haematologica* 2010; 95: 424-431.
 15. Chanda B., Ditadi A., Iscove N.N., Keller G. Retinoic Acid Signaling Is Essential for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell* 2013; Vol. 155. Issue 1, p. 215-227.
 16. Choudhry A., Loughery T.D., Bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia, *American Journal of Hematology* 2012.
 17. Darzinkiewicz Z., Holden E., Orfao A., Telford W., Wlodkowic D. Recent Advances in Cytometry, Part B. 2011.
 18. Dekking E.H.A., Velden V.J.H., Varro R., Wai H., Böttcher S., Kneba M., Sonneveld S., Koning A., Boeckx N., Poecke N., Lucio P., Mendonça A., Sedek L., Szczepański T., Kalina T., Kanderová V., Hoogeveen P., Montero J.F., Chillón M.C., Orfao A., Almeida J., Evans P., Cullen M., Noordijk A.L., Vermeulen P.M., Man M.T., Dixon E.P., Bitter W.M., Dongen J.J.M. Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML–RARA fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26 p. 1976-1985.
 19. Dong H.Y., Kung J.X., Bhardwaj V., Gill J. Flow Cytometry Rapidly Identifies All Acute Promyelocytic Leukemias With High Specificity Independent of Underlying Cytogenetic Abnormalities. *American Journal of Clinical Pathology* 2011; p. 76-84.
 20. Degos, L. Historical review: The history of acute promyelocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2003; 122, 539–553.

21. Dimov N.D., Meideros J., Ravandi F., Ramos E.B. Acute Promyelocytic Leukemia at Time of Relapse Commonly Demonstrates Cytogenetic Evidence of Clonal Evolution and Variability in Blast Immunophenotypic Features. *American Journal of Clinical Pathology* 2010; p. 484-490.
22. Doulotov S., Notta F., Laurenti E., Dick J.E., Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell*. 2012.
23. Duffield A.S., Aoki J., Levis M., Cowan K., Gocke C.D., Burns K.H., Borowitz M.J. Clinical and Pathologic Features of Secondary Acute Promyelocytic Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* 2012; Vol 1., p. 395-402.
24. Dunphy C.H., Tang W. The Value of CD64 Expression in Distinguishing Acute Myeloid Leukemia With Monocytic Differentiation From Other Subtypes of Acute Myeloid Leukemia: A Flow Cytometric Analysis of 64 Cases. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2007; Vol. 131 (5), p.748-754.
25. Ersvaer E., Immunological aspects of acute myelogenous leukemia. Dissertation for the degree philosophiae doctor, Univesiry of Bergen, Norway 2007.
26. Free-ed.net, prieiga per internetą <http://www.free-ed.net/free-Ed/Resources/PubServ/EMS/EMS%20Primer/emsPrimer01.asp?iNum=704>, [Žiūrėta 2015 12 18]
27. Gennaro L.J. Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia and Lyphoma Society* 2011.
28. Gorczyca W. Acute promyelocytic leukemia: four distinct patterns by flow cytometry immunophenotyping. *Polish Journal of Pathology* 2011.
29. Greer J.P., Adamko D.J., Agarwal N., et al. *Wintrobe's Clinical Hematology* 12th Edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106 USA 2009.
30. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V., Walker H., Chatters S., Goldstone A.H., Wheatley K., Harrison C.J., Burnett A.K. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2011; 116 (3).
31. Gocek E., Marcinkowska E. Differentiation Therapy of Acute Myeloid Leukemia, *Cancers* 2011; ISSN 2072-6694.
32. Hasserjian R.P. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. *International Journal of Laboratory Hematology* 2013; 35, p. 358-366.
33. Hayden M.S., Ghosh S., NF-kB in immunobiology. *Cell Research* 2011; 21:223-244

34. He Y., Wang P., Liang K., Chen X., Du W., Li J., Hu Y., Bai Y., Liu W., Li X., Jin R., Zhang M., Zheng J. A Pediatric Acute Promyelocytic Leukemia With a Rare Karyotype of $ider(17)(q10)t(15;17)$ and Favorable Outcome. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(41) e1778.
35. HematologyOutlines.com, prieiga per internetą: http://hematologyoutlines.com/atlas_topics/27.html [Žiūrėta 2015 03 05].
36. Huh D., Gu W., Kamotani Y., Grotberg J.B., Takayma S. Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles, *Physiol Meas* 2005; 26 p. R73-R98.
37. Juozaitytė E., Adukauskienė D., Basevičius A., Dambrauskienė R., Gerbutavičius R., Inčiūra A., Jančiauskienė R., Janulytė Ž., Karaivičė L., Liutkauskienė S., Mongirdienė A., Remeikienė D., Rudžianskienė M., Simaškienė E., Skorupskienė D., Skrodenienė E., Steponavičiūtė R., Ugenskienė R., Verygienė R., Vitkauskienė A. *Onkologija ir hematologija*, Kaunas 2014.
38. Kothian S.D., Besa E. C., Talavera C., Sacher R. *Acute Promyelocytic Leukemia Treatment and Management* 2015.
39. Lane S.W., Scadden D.T., Gililand D.G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 2009; V. 114, Issue 6, p.1150-1157.
40. Larson R.A, Anastasi J. *Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of acute promyelocytic leukemia in adults* 2013.
41. Legues M.E., Franco G., Bertin P. Estudio piloto de la fusion PML/RAR α por el metodo de hibridacion *in situ* con fluorescencia (FISH) en leucemia aguda promielocitica, *Rev.med., Chile* 2002; v.130 n.7, Santjago jul.
42. Lehman S., Ravin A., Carlsson L., Antunovic P., Deneberg S., Mollgard S., Derolf A.R., Stockerlberg D., Tidefelt U., Wahlin A., Wennstrom L., Hoglund M., Juliusson G. Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. *Leukemia* 2011; 25 p. 1128-1134.
43. Luka D., PathologyOutlines.Com. Prieiga per internetą: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowneutrophilmaturation.html>
44. Lo-Cocco F., Cicconi L. *History of Acute Promyelocytic Leukemia: A Tale of Endless Revolution* 2011.
45. Mathur S., Schiexneider K., Hutchison R.E. *Hematopoiesis. Henry`s Clinical Diagnosis and Management By Labatory Metods* 2007.

46. Lotodo T.L.C. Use of flow cytometry immunophenotyping for diagnosis of leukemia at moi teaching and referral hospital 2014; Prieiga per internetą: <http://www.slideshare.net/dmryongesa1/use-of-flow-cytometric-immunophenotyping-by-teresa-lotodo> [Žiūrėta 2016 02 25]
47. Macey M.G., Flow cytometry Principles and Applications 2007.
48. Matsuo T., Kuriyama K., Miyazaki J., Yoshida S., Tomonaga M., Emi N., Kobayashi T., Miyawaki S., Matsushima T., Sninagawa K., Honda S., Ohno R. The percentage of myeloperoksidase-positive blast cells is a strong independent prognostic factor in acute myeloid leukemia, even in patients with normal karyotype, LEUKEMIA 2002; 17, p. 1538- 1543
49. Matuzevičienė R. Tėkmės citometrija ir jos taikymas klinikinėje praktikoje, Vilnius 2010.
50. Matuzevičienė R., Tėkmės citometrija ir jos taikymas laboratorinėje medicinoje, Vilnius 2013.
51. MediaLab 2015, <https://www.medialabinc.net/spg448405/promyelocyte.aspx>
52. Medvinsky A., Rybstov S., Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development 2011; 138 p.1017-1031
53. Michael E., Rytting M., Overview of Leukemia 2014.
54. Mufti G.J., Flandrin G., Schaefer H.E., Sandberg A., Kanfer E.J. AN ATLAS OF MALIGNANT HAEMATOLOGY, Cytology, Histology and Cytogenetics 1996.
55. National Cancer Institute, prieiga per internetą <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet> [Žiūrėta 2016 01 28]
56. Ostronoff F., Othus M., Lazenby M., Estey E., Appelbaum F.R., Evans A., Godwin J., Gilkes A., Kopecky K.J., Burnett A., List A.F., Fang M., Oehler V.G., Petersdorf S.H., Pogossova-Agadjanyan E.L., Radish J.P., Willman C.L., Meshinchi S., Stirewalt D.L. Prognostic Significance of NPM1 Mutations in the Absence of FLT3–Internal Tandem Duplication in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia: A SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council Report. Journal of Clinical Oncology 2015; JCO 2014.58.0571.
57. Powell B.L., Moser B., Stock W., Gallagher R.E., Willman C.L., Stone R.M., Rowe J.M., Coutre S., Feusner J.H., Gregory J., Couban S., Appelbaum F.R., Tallman M.S., Larson R.A. Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. Blood Journal 2010; 116(19).

58. Pratcorona M., Brunet S., Nomdedéu J., Ribera J.M., Tormo M., Duarte R., Escoda L., Guàrdia R., Llano M.P., Salamero O., Bargay J., Pedro C., Martí J.M., Torreadell M., Díaz-Beyá M., Camós M., Colomer D., Hoyos M., Sierra J., Esteve J. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *BLOOD* 2013; Vol.121, Iss.14, p. 2734-2738.
59. Ravandi F., Estey E., Jones D., Faderl S., Brien S., Fiorentino J., Pierce S., Blamble D., Estrov Z., Wierda W., Ferrajoli A., Verstovsek S., Manero G.C., Cortes J., Kantarjian H. Effective Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia With All-Trans-Retinoic Acid, Arsenic Trioxide, and Gemtuzumab Ozogamicin, *JOURNAL of CLINICAL ONCOLOGY* 2009; 27(4) 504-510.
60. Rizzatti E.G., Portieres F.L., Martins S.L.R.,Rego E.M., Zago M.A.,Falcao R.P., Microgranular and t(11;17)/PLZF-RARa Variants of Acute Promyelocytic Leukemia Also Present the Flow Cytometric Pattern of CD13, CD34, and CD15 Expression Characteristic of PML-RARa Gene Rearrangement, *American Journal of Hematology* 2004; 76 p. 44-51.
61. Rothe G. Technical Background and Methodological Principles of Flow Cytometry 2009.
62. Pernick N., 2002-2015, CD Markers, PathologyOutlines.com
63. Rawley T. Flow-Cytometry –A survey and the Basics, Columbia University, United States 2015.
64. Picot J., Guerin C.L., Kim C., Boulanger C.M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation, *Cytotechnology* 2012; 64(2) p. 109-130
65. OMIM, prieiga per internetą <http://www.omim.org/entry/612376> [Žiūrėta 2016 01 31]
66. Ossenkoppele G.J., Loosdrecht A .A., Schuurhuis G.J. Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms. Department of Haematology, VU University Medial Center, Amsterdam, the Netherlands 2011.
67. Sanz M.A., Grimwade D., Tallman M.S., Lowenberg B., Fenaux P., Estey E.H., Naoe T., Lengfelder E., Buchner T., Dohner H., Burnett A.K., Lo-Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood Journal* 2009; 113 (9).
68. Sanz M.A., Montesinos P. Open issues on bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukemia, *Thromb Res* 2010; 125(2).

69. Schnittger S., Bacher U., Haferlach C., Kern W., Alperman T., Haferlach T. Clinical impact of FLT3 mutation load in acute promyelocytic leukemia with t(15;17)/PML-RARA. *Haematologica* 2011; Vol. 96(12).
70. Steele B., Wu N.C., Whitcomb C. White Blood Cell and Platelet Counting Performance by Hematology Analyzers: A Critical Evaluation, *Laboratory Hematology* 2001; 7 p. 255-266.
71. Tallman M.S., Abutalib S.A., Altaman J.K. The Double Hazard of Thrombophilia and Bleeding in Acute Promyelocytic Leukemia, *Semin Thromb Hemost* 2013; 33, p. 330-338.
72. Tallman M., Kim H.T., Montesinos P., Appelbaum F.R., Serna J., Bennet J.M., Deben G., Bloomfield C.G., Gonzalez J., Feusner J.H., Gonzalez M., Gallagher R., Miguel J.D.G.S., Larson R.A., Milone G., Paietta E., Rayon C., Rowe J.M., Rivas C., Schiffer C.A., Vellenga E., Shepherd L., Slack J.L., Wiernik P.H., Willman C.L., Sanz M.A. Does microgranular variant morphology of acute promyelocytic leukemia independently predict a less favorable outcome compared with classical M3 APL? A joint study of the North American Intergroup and the PETHEMA Group. *Blood* 2010; 116(25) p. 5650-5659.
73. Tsiftoglou A.S., Vizirianakis I.S., Strouboulis J. Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 2009; Vol 61., Issue 8, p. 800-830.
74. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; **100** (7): 2292–302. doi:10.1182/blood-2002-04-1199. PMID 12239137.
75. Wang Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable, *Blood* 2008; 111 (5).
76. Xu F., Yin Ch.X., Wang Ch.L., Jiang X.J., Jiang L., Wang Z.X., Yi Z.S., Huang K.K., Meng F.Y. Immunophenotypes and Immune Markers Associated with Acute Promyelocytic Leukemia Prognosis. Hindawe Publishing Corporation 2014;, Article ID 421906.
77. Yoshii M., Ishida M., Yoshida T., Okuno H., Nakanishi R., Horinouchi R., Hodohara K., Okabe H. Clinicopathological features of acute promyelocytic leukemia: an experience in one institute emphasizing the morphological and immunophenotypic changes at the time of relapse. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(10) p.2192-2198.

78. Zaidi S. Acute promyelocytic leukemia (APL) with t(15;17)(q22;q12); PML-RAR α 2013.
79. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976; 33 (4): 451–8.
80. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. 2008.

PRIEDAI

	Tyrimo data	LIN	Gimimo metai	Vardas, pavardė	Lytis	Ėminys	Leukocitai Hb		Trombocitai	Blastų%	Morfologija	Auerio lazdeles
1	2008 01 28	z8-1264	1971 03 25	AML 1	1	1	245	67,6	132	89	1	1
2	2008 05 21	8-13510	1956 01 12	AML 2	2	1	8,42	72,6	37,5	22	2	2
3	2008 08 11	kjl	1974 06 19	AML 3	1	1	1,1	85,5	113	68	1	1
4	2008 09 17	8-23622	1963 06 03	AML 4	1	1	0,43	90,2	15	65	1	1
5	2008 09 19	kjl	1945 07 06	AML 5	1	1	2,28	120	173	45	2	2
6	2008 10 01	kjl	1951 11 09	AML 6	2	1	0,6	81	41	75	1	1
7	2008 10 27	8-27515	1964 06 03	AML 7	1	2	145	63,8	17,7	25	2	2
8	2008 12 23	kjl	1966 01 22	AML 8	1	1	1,9	77	28	84	1	1
9	2009 03 31	kjl	1954 10 10	AML 9	1	1	8,82	79,9	48,9	68	1	1
10	2009 04 24	9-11531	1974 08 17	AML 10	1	1	4,25	69,5	14,1	60	1	1
11	2009 05 12	9-12993	1933 06 14	AML 11	1	1	0,72	47,4	5	55	1	2
12	2009 06 30	9-17504	1948 08 15	AML 12	2	2	14,3	136	61,6	60	2	2
13	2009 07 08	9-18402	1944 03 17	AML 13	2	2	165	143	38	82	1	2
14	2009 10 30	x9-9662	1961 11 01	AML 14	2	1	3,84	149	379	25	1	1
15	2009 12 14	9-32605	1973 08 25	AML 15	1	2	6,55	59	20,3	73	1	2
16	2010 04 30	10-11318	1957 10 01	AML 16	1	1	28,61	119,4	12,6	86	1	1
17	2010 05 26	10-14034	1920 11 02	AML 17	1	2	55	54,9	30,5	90	2	1
18	2010 07 13	10-17934	1932 05 10	AML 18	1	2	18,5	92,6	53,6	44	2	2
19	2010 07 30	kjl	1956 01 19	AML 19	2	2	66	129	53,6	85	1	1
20	2010 11 05	kjl	1962 06 05	AML 20	1	2	10,5	62,8	28,6	80	1	2
21	2011 01 04	11-248	1992 12 04	AML 21	1	1	9,63	99,1	9	87	1	1
22	2011 01 05	kjl	1975 01 05	AML 22	1	2	149,5	71,6	5,7	91	2	2
23	2011 04 07	kjl	1946 02 27	AML 23	1	1	114,2	119,4	30,6	85	2	2
24	2011 05 17	11-14206	1973 06 10	AML 24	2	2	66,34	107,7	61,4	73	2	2
25	2011 06 08	11-16780	1967 01 18	AML 25	2	1	0,97	140	10	72	1	1
26	2011 06 10	11-17001	1973 01 01	AML 26	1	1	261	97	25	85	2	1
27	2011 06 17	11-17739	1988 03 25	AML 27	2	2	42,41	105	44,5	80	1	1
28	2011 07 26	kjl	1966 06 17	AML 28	1	1	26	92,1	33	88	1	1
29	2011 12 22	CR11-1331	1961 08 19	AML 20	2	1	1,3	108	176	50	1	2
30	2011 12 23	11-36516	1967 07 04	AML 30	2	1	32,04	121	26	80	1	1
31	2012 01 12	12-1498	1990 10 13	AML 31	1	1	6,83	89	46	77	2	2
32	2012 02 15	12-5285	1955 04 09	AML 32	1	1	65,4	83	120	30	2	2
33	2012 02 22	CR12-2024	1972 08 25	AML 33	1	1	1,95	124	90	20	1	1
34	2012 02 28	12-6707	1960 01 14	AML 34	2	2	261,9	78,7	127,4	78	2	1
35	2012 03 28	CR12-3854	1948 09 24	AML 35	2	2	132,4	123,5	27,2	93	2	2
36	2012 04 26	CR12-5055	1967 07 04	AML 36	1	1	0,26	82	18	54	1	2
37	2012 06 06	12-18275	1967 07 04	AML 37	1	1	5,28	83	52	75	1	1
38	2012 06 26	kjl	1947 10 12	AML 38	1	1	28	115	22	20	2	2
39	2013 04 03	CR13-4072	1951 05 15	AML 39	1	2	32,79	83	30	78	1	2
40	2013 05 24	13-16913	1962 04 26	AML 40	2	2	19,73	101,3	21,9	49	1	2
41	2013 08 23	13-26502	1930 09 10	AML 41	2	1	3,27	80	84	60	2	1
42	2013 09 09	CR13-1100	1936 09 19	AML 42	1	2	105,1	79,4	78	35	2	2
43	2013 10 01	CR13-1198	1964 06 04	AML 43	1	1	0,75	84	37	23	1	2
44	2013 10 24	CR13-1324	1934 11 27	AML 44	1	2	18,63	99,4	109,4	33	1	1
45	2013 11 19	KJL	1956 02 05	AML 45	1	1	5,72	97	39	80	1	1
46	2014 01 22	KJL	1992 02 22	AML 46	1	1	8	61	21	70	1	1
47	2014 02 03	CR14-1704	1943 05 14	AML 47	1	1	2,83	136	716	31	2	2
48	2014 06 26	KJL	1946 06 23	AML 48	1	2	13,94	77,7	53,3	76	2	2
49	2014 09 25	14T-660	1963 08 12	AML 49	1	2	111,2	93,8	12,4	75	2	2
50	2014 11 03	14-39196	1989 12 15	AML 50	1	1	4,11	97	142	73	1	2
51	2014 12 17	14T-844	1969 05 11	AML 51	2	1	1,14	108	45	81	1	1
52	2014 12 19	14-45950	1956 02 04	AML 52	1	2	119,6	116,5	20,2	79	2	2
53	2015 01 13	KJL	1949 10 01	AML 53	2	1	1,5	104	19	81	1	2
54	2015 02 06	15-5313	1995 06 28	AML 54	2	1	116,11	75	10	93	2	2
55	2015 03 19	15-11148	1953 12 09	AML 55	1	1	2,48	124	231	50	2	2
56	2015 05 29	15-21397	1985 08 24	AML 56	1	1	1,02	94	42	81	1	1
57	2015 07 01	15-25725	1936 08 30	AML 57	1	2	24,49	100,1	12,8	80	2	1
58	2015 07 02	KJL	1943 06 19	AML 58	2	2	41,89	90,9	17,6	94	2	1
59	2015 07 24	KJL	1955 10 22	AML 59	1	1	103	60	10	79	2	2
60	2015 08 19	KJL	1960 04 03	AML 60	2	2	37,6	59	56	60	2	2
61	2015 09 04	KJL	1957 02 04	AML 61	1	2	1	95	24	85	1	1
62	2015 09 09	KJL	1952 09 12	AML 62	1	2	24,2	69,4	8,4	94	1	1
63	2015 10 17	15-39304	1960 02 29	AML 63	1	2	22,06	93,3	22	74	1	1
64	2015 10 30	15-41157	1931 05 01	AML 64	1	2	120,2	80,9	50,3	93	1	1

Priedas Nr. 1. Pacientų demografiniai, morfologijos ir kraujo tyrimų duomenys

Vardas, pė SSC 1-auki:HLA	HLA%	CD34 1-ry:	CD34%	CD117	CD117%	CD33	CD33%	CD13	CD13%	CD2	CD2%	CD56	CD56%	CD64	CD64%	CD15	CD15%		
AML 1	1	6	1	6	1	4	82	1	99	4	81	6	2	6	1	2	80	6	2
AML 2	3	6	6	6	1	1	81	1	98	6	6	6	2	6	3	6	7	6	15
AML 3	1	6	10	6	21	1	87	1	100	1	99	6	1	6	2	4	99	2	26
AML 4	1	6	3	2	72	2	10	1	98	2	44	2	60	1	98	2	13	6	8
AML 5	3	6	3	6	1	4	84	1	99	2	23	6	1	6	18	6	4	6	1
AML 6	1	6	1	6	1	2	78	1	100	5	64	6	6	5	78	4	91	2	38
AML 7	2	6	11	6	5	6	96	4	100	6	93	6	1	6	12	6	98	6	49
AML 8	1	6	1	6	5	2	96	1	100	1	93	6	1	6	12	4	98	2	49
AML 9	3	6	1	6	9	2	36	1	100	1	99	6	1	2	91	3	55	2	54
AML 10	1	6	1	6	1	2	80	2	50	6	5	2	25	6	1	4	60	6	3
AML 11	1	6	2	6	8	1	94	1	99	4	98	2	37	6	2	2	73	6	1
AML 12	3	6	2	6	1	2	53	2	100	2	20	6	1	6	2	6	15	6	2
AML 13	3	6	1	6	1	2	56	4	100	4	88	6	1	1	100	6	16	6	1
AML 14	2	6	7	2	2	4	79	1	95	6	10	4	67	6	15	2	38	6	1
AML 15	2	6	6	3	66	2	49	1	99	2	4	4	77	4	88	6	14	2	20
AML 16	1	6	6	6	2	4	90	1	100	4	97	5	75	2	24	4	99	6	3
AML 17	3	6	1	6	1	2	91	1	100	6	1	6	1	6	1	6	1	6	3
AML 18	1	6	19	6	1	3	39	1	100	2	68	6	1	6	1	4	99	4	98
AML 19	3	6	3	6	8	2	81	1	100	4	93	4	89	6	1	2	49	6	1
AML 20	1	6	1	6	1	6	11	1	100	1	100	6	3	2	36	4	99	6	2
AML 21	1	6	5	6	9	4	88	1	100	4	97	2	20	6	3	2	86	2	21
AML 22	3	6	1	6	1	2	35	1	100	2	25	6	1	3	30	2	19	6	1
AML 23	3	6	2	6	1	5	79	1	100	2	21	6	1	1	95	6	1	6	1
AML 24	3	6	6	6	1	2	22	1	100	6	10	6	1	6	1	2	67	6	12
AML 25	1	6	1	6	1	4	87	1	99	4	81	2	30	6	1	2	46	6	12
AML 26	3	6	3	6	1	5	58	1	100	5	52	6	1	6	13	6	1	6	1
AML 27	2	6	1	6	1	2	20	1	99	4	99	6	5	6	9	2	64	6	1
AML 28	1	6	1	2	22	4	100	1	100	1	93	2	22	6	1	4	89	6	2
AML 29	3	6	13	6	1	4	87	1	95	6	10	6	6	6	9	2	46	6	12
AML 30	2	6	1	6	2	5	82	4	99	5	72	6	1	2	54	2	42	6	1
AML 31	3	6	1	3	20	5	80	4	96	6	11	6	1	5	29	6	1	6	2
AML 32	3	6	6	3	38	6	12	1	97	4	87	6	1	6	1	6	7	6	2
AML 33	3	6	15	6	16	4	100	2	88	6	15	6	1	6	5	6	3	6	5
AML 34	3	6	11	6	1	4	93	5	97	4	96	6	1	6	1	2	41	6	2
AML 35	3	6	1	6	1	2	91	2	98	2	30	6	1	5	62	6	1	6	1
AML 36	1	6	1	2	59	5	80	1	99	5	73	2	37	6	3	4	93	6	15
AML 37	1	6	1	6	1	4	94	1	100	5	99	6	1	6	2	2	76	6	12
AML 38	3	6	4	4	100	6	2	2	92	2	48	6	1	6	13	6	16	6	1
AML 39	1	6	1	6	1	2	38	4	100	6	1	6	1	6	1	6	12	6	3
AML 40	3	6	13	6	1	5	89	2	99	6	1	6	1	6	5	2	65	6	1
AML 41	3	6	15	6	5	4	94	6	21	2	21	6	1	6	3	6	4	6	3
AML 42	3	6	13	6	7	4	99	4	96	2	42	6	2	6	1	2	26	6	3
AML 43	2	6	2	5	81	4	78	4	99	4	86	2	93	6	1	6	1	6	6
AML 44	3	6	6	6	9	4	94	4	100	2	68	6	1	6	2	6	3	6	5
AML 45	1	6	1	6	14	4	94	1	96	1	99	6	4	6	9	2	47	6	6
AML 46	1	6	1	6	1	2	56	4	89	5	76	6	1	6	1	2	53	6	2
AML 47	3	6	7	6	4	4	88	4	92	2	42	6	1	6	1	6	2	6	3
AML 48	3	6	1	6	1	4	81	4	99	2	23	6	1	2	30	6	1	6	2
AML 49	2	6	1	6	1	2	52	2	80	2	78	6	1	2	21	6	11	6	2
AML 50	1	6	2	2	25	4	92	1	100	1	99	2	22	6	10	4	100	2	26
AML 51	1	6	2	6	4	1	98	1	100	1	100	6	1	2	64	2	99	6	15
AML 52	2	6	1	6	1	2	53	4	99	2	63	6	1	6	4	6	7	6	2
AML 53	1	6	1	6	1	2	87	1	94	1	98	6	2	6	1	4	90	5	100
AML 54	2	6	1	6	2	5	70	1	96	5	64	3	60	2	20	6	3	6	10
AML 55	1	6	1	6	1	4	87	1	100	1	94	6	1	2	34	6	2		5
AML 56	1	6	1	6	1	2	99	1	100	1	100	6	1	6	2	4	99	2	57
AML 57	2	6	1	6	1	2	20	4	99	5	58	6	1	6	1	2	71	3	42
AML 58	1	6	11	6	4	4	99	4	99	1	100	6	1	6	1	2	55	6	2
AML 59	1	6	11	3	25	5	71	2	86	3	28	6	4	5	80	2	68	6	6
AML 60	1	6	1	6	9	4	94	1	95	5	89	6	1	6	1	6	3	6	2
AML 61	2	6	1	6	6	2	81	1	100	5	67	6	6	6	2	4	92	2	34
AML 62	1	6	1	6	1	2	22	4	99	1	100	6	1	6	1	2	99	2	19
AML 63	1	6	8	2	19	4	82	2	95	1	93	6	8	6	1	4	91	6	3
AML 64	3	6	6	6	1	5	60	1	100	2	57	6	1	5	97	6	12	6	1

Priedas Nr.2. Pacientų blastų biožymenų raiškos duomenys.

Vardas, pavardė	Translokacija t(15;17)(q22;21)	Kitos translokacijos
AML 1	BCR	
AML 2		NPM1 I tipas
AML 3	BCR	
AML 4	BCR	
AML 5		NPM1 I tipas
AML 6	BCR	
AML 7	BCR	
AML 8	BCR	
AML 9	BCR	
AML 10	BCR	
AML 11	BCR	
AML 12		FLT3, NPM1
AML 13	BCR	
AML 14	BCR	
AML 15	BCR	
AML 16	BCR	
AML 17	NĖRA	NĖRA
AML 18	NĖRA	NĖRA
AML 19	BCR	
AML 20	BCR	
AML 21	BCR	
AML 22		NPM1 I tipas
AML 23		NPM1, FLT3
AML 24		NPM1
AML 25	BCR	
AML 26		FLT3, NPM1
AML 27	NEATLIKTA MIRĖ	
AML 28	BCR	
AML 29	NĖRA	NĖRA
AML 30	BCR	
AML 31		NPM1
AML 32	BCR	
AML 33	NĖRA	NĖRA
AML 34		NPM1,FLT3
AML 35		FLT3
AML 36	BCR	
AML 37	BCR	
AML 38		NPM1
AML 39		FLT3
AML 40		FLT3
AML 41	NĖRA	NĖRA
AML 42	NĖRA	NĖRA
AML 43	BCR	
AML 44		NPM1 I tipas
AML 45	BCR	
AML 46	BCR	
AML 47		NPM1 I tipas
AML 48	BCR	
AML 49		NPM1,FLT3
AML 50	BCR	
AML 51	BCR	
AML 52		FLT3, NPM1
AML 53	BCR	
AML 54		NPM1
AML 55		NPM1,FLT3
AML 56	BCR	
AML 57		NPM1, FLT3
AML 58	NĖRA	NĖRA
AML 59		NPM1
AML 60		FLT3,NPM1
AML 61	BCR	
AML 62	BCR	
AML 63	NĖRA	NĖRA
AML 64		FLT3, NPM1

Priedas Nr. 3. Pacientų molekulinį genetinių tyrimų duomenys.